ORSAY
Série A
N° d'ordre

1140

THÈSE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Claudine AMAR née NACASCH

Sujet : **Contribution à l'étude des constituants biologiquement actifs des souches humaines de MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

SOUTENUE LE 22 JUIN 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. E LEDERER — PRESIDENT

H CLAUSER
J F PETIT
MME E VILKAS — EXAMINATEURS

ORSAY
Série A
N° d'ordre

1140

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

Claudine AMAR née NACASCH

Sujet : **Contribution à l'étude des constituants biologiquement actifs des souches humaines de MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

SOUTENUE LE 22 JUIN 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. E LEDERER — PRÉSIDENT

H CLAUSER
J F PETIT
MME E VILKAS
— EXAMINATEURS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes Parents

à David

et Aviva

A Monsieur le Professeur E. Lederer, Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, à Gif-sur-Yvette, qui me fit l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire, de me confier ce travail, et de me prodiguer tant de marques d'intérêt.

En témoignage de ma respectueuse gratitude.

Je le remercie d'avoir bien voulu accepter la présidence du Jury de cette thèse.

A Madame E. Vilkas, Maître de Recherche au C.N.R.S., qui m'a fait profiter de son expérience et m'a guidée par ses conseils précieux et ses critiques judicieuses.

En témoignage de ma profonde gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur H. Clauser et Monsieur J-F. Petit, Maître de Recherche au C.N.R.S., d'avoir bien voulu accepter de faire partie du Jury.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur P. Sinay pour son bienveillant accueil au sein de son équipe, lors d'un stage.

Je remercie également Monsieur le Professeur J. André et Mademoiselle E. Zissmann pour les travaux qu'ils ont bien voulu effectuer pour moi.

Que tous les artisans de l'esprit d'équipe et de l'ambiance de sympathie dont ils m'ont entourée trouvent ici l'expression de mon amitié, en particulier Mademoiselle H. Tabaud et Monsieur J-C. Massot.

Publications

C. NACASCH et E. VILKAS.- Sur la présence de deux types de mycosides dans le Mycobacterium kansasii
C.R.Acad.Sci., 265C, 413-415 (1967).

E. VILKAS, J-M. DELAUMENY et C. NACASCH.- Sur la structure du polysaccharide des Cires D d'une souche humaine virulente de Mycobacterium tuberculosis
Biochim.Biophys.Acta, 158, 147-150 (1968)

C. AMAR-NACASCH et E. VILKAS.- Etude des parois d'une souche humaine virulente de Mycobacterium tuberculosis. I. Préparation et analyse chimique.
Bull.Soc.Chim.Biol., 51, 613-620 (1969).

C. AMAR-NACASCH et E. VILKAS.- Etude des parois de Mycobacterium tuberculosis. II. Mise en évidence d'un mycolate d'arabinobiose et d'un glucane dans les parois de M.tuberculosis $H_{37}R_a$.
Bull.Soc.Chim.Biol., 52, 145-151 (1970).

E. VILKAS, J. MARKOVITS, C. AMAR-NACASCH, E. LEDERER.- Sur la présence d'unités de D-galactofurannose dans l'arabinogalactane des parois et des Cires D de souches humaines de Mycobacterium tuberculosis.
C.R.Acad.Sci., 273C, 845-848 (1971).

E. VILKAS, C. AMAR-NACASCH, J. MARKOVITS, J.F.G. VLIEGENTHART et J.P. KAMERLING.- Occurence of a galactofuranose disaccharide in immunoadjuvant fractions of Mycobacterium tuberculosis (cell walls and Wax D)
Biochim.Biophys.Acta, 297, 423-435 (1973).

Table des Matières

INTRODUCTION 1

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I: Préparation des Parois-Isolement-Délipidation-Purification 6

CHAPITRE II: Dégradation des Parois 13

I. Extraction par le chlorhydrate de phénylhydrazine 13

II. Extraction par le phénol 13

III. Oxydation periodique 15

IV. Hydrolyse alcaline 17

Analyse de l'arabinogalactane 20

V. Hydrolyse acide ménagée 25

Fraction hydrosoluble 25

Etude du disaccharide 27

Synthèse du disaccharide 48

Le trisaccharide 50

Examen des glycolipides 51

Lipides liés 55

Glucane 57

Digestion du mucopeptide par le lysozyme 61

VI. Acétolyse des parois: Lipoprotéine 63

CHAPITRE III: Recherche de l'acide polyglutamique 67

CHAPITRE IV: Peptidolipides 70

CHAPITRE V: Influence de la D-cycloserine sur la biosynthèse des Cires D 76

DISCUSSION - CONCLUSION 80

TECHNIQUES ANALYTIQUES 86

TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES 87

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I.- Préparation des parois 91

CHAPITRE II.- Dégradation des parois 97

CHAPITRE III.- Recherche de l'acide polyglutamique 121

CHAPITRE IV.- Peptidolipides 123

CHAPITRE V.- Influence de la D-cycloserine sur la biosynthèse des Cires D 126

BIBLIOGRAPHIE 130

Errata

Page 14:

Tableau III: Histidine au lieu de Mistidine

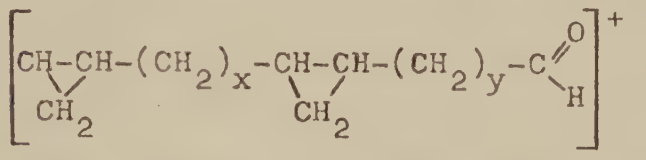
Page 16:

Colonne (2) µmoles: Acide muramique, lire 19,5

Page 18:

Lire: les pics moléculaires des différents homologues

Page 19:

formule: 

min. X = 5

Page 21:

Lire 2,5 au lieu de 2

Page 27:

Lire 4-O-α-D-galactopyrannosyl-D-galactopyrannose au lieu de 4-O-β-D-galactopyrannosyl-D-galactopyrannose.

Page 29:

Tableau VII: lire 4-O-α-D-galactopyrannosyl-D-galactose et 4-O-β-D-galactopyrannosyl-D-galactose

au lieu de:

4-O-x-D-galactofurannosyl-D-galactose et 4-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose

Page 30:

Dans le tableau VIII, les R_f du glycérol et de l'éthylène glycol sont inversés.

Page 50:

Ligne 14:..... dans ces conditions. Le produit est perméthylé.

Page 52:

Légende de la Fig. 16: arabinose, tréhalose, raffinose peracétylés.

Page 65:

Lire: une série de pics à 298, 294, 281, 263.

INTRODUCTION

Les mycobactéries dont le représentant le plus prestigieux et le mieux caractérisé est Mycobacterium tuberculosis, l'agent de la tuberculose découvert par Koch en 1882, constituent un groupe bactérien très vaste qui a tôt attiré l'attention de nombreux chercheurs.

Les travaux entrepris ont été d'emblée menés dans deux directions:

1°) La recherche d'un vaccin efficace contre la tuberculose

2°) L'étude de la composition chimique des bacilles tuberculeux et de la corrélation éventuelle entre les constituants et les manifestations pathologiques qu'ils entraînent.

De nombreux essais de vaccination par les bacilles tués ont été tentés. Une certaine immunité a pu être conférée aux animaux de cette façon, mais elle était souvent passagère et toujours inférieure à celle provoquée par l'inoculation des bacilles vivants (1, 2, 3).

C'est en essayant de rendre une souche de M.tuberculosis bovis avirulente par une méthode de culture appropriée que Calmette et Guérin ont mis au point le vaccin, BCG utilisé actuellement en clinique (3).

Le BCG, l'unique vaccin contre la tuberculose, est employé aujourd'hui dans le monde entier, et son efficacité n'est plus à démontrer. Mais, comme tout bacille tuberculeux vivant, il présente quelques inconvénients:

- il provoque notamment la formation d'un granulome pulmonaire (4), l'hypersensibilité à la tuberculine (5), et sensibilise en même temps aux endotoxines bactériennes (gram-négatives), est responsable de l'hypertrophie des organes lymphoïdes (6, 7) et peut induire éventuellement des maladies auto-immunitaires

comme, par exemple, la polyarthrite allergique (8, 9).

Le bacille vivant semble donc contenir des fractions dotées de propriétés immunisantes et des fractions toxiques. Sont-elles les mêmes? De nombreux auteurs se sont attachés à élucider ce problème. L'isolement et l'étude de la structure chimique de différents constituants de M.tuberculosis suivis des tests biologiques appropriés devraient apporter les réponses à ces questions.

En raison de la teneur élevée en lipides des mycobactéries signalée déjà en 1888 par Hammerschlag (10), ces fractions ont fait l'objet d'un nombre impressionnant de recherches. Ainsi, de nombreuses publications parues aux Etats Unis à ce sujet, sont dues à R.J. Anderson et son équipe (11,12). En France, les travaux d'Edgar Lederer et ses collaborateurs (13) ont apporté une contribution extrêmement importante.

La structure des lipides de M.tuberculosis est aujourd'hui pratiquement élucidée (13, 14).

Le rôle biologique de certaines fractions a été signalé. Ainsi, les phospholipides se sont vus attribuer des propriétés immunisantes (3, 15).

Nègre et Boquet (16) rapportent que l'extrait méthanolique de bacilles préalablement délipidés par l'acétone (antigène méthylique) protège les animaux contre la tuberculose (16b). Ces travaux ont été confirmés par Weiss et Dubos (17). Or, l'antigène méthylique contient surtout un mélange de phospholipides et de "Cord Factor" (18).

Le "Cord Factor" [dimycolate de tréhalose (19)] semble d'après les travaux de Bekierkunst et collaborateurs (20) conférer aux animaux traités une immunité spécifique contre la tuberculose. Il produit toutefois des granulomes et l'hyperphasie des organes lymphoïdes (4, 6, 7).

Une fraction peptidoglycolipidique "les Cires D" mérite une mention spéciale.

Les travaux de Coulaud (21) (1935) repris par Freund en 1956 (22) ont abouti à la préparation d'un"adjuvant de Freund"

qui consiste en une émulsion d'eau dans l'huile de paraffine contenant des mycobactéries tuées. L'administration de cet adjuvant en présence d'un antigène à un animal accroît le taux d'anticorps produits. Or, White et coll. (23) ont constaté que les Cires D de souches humaines, peuvent remplacer les bacilles entiers tués dans cette préparation. Récemment, Adam et coll. (112) ont obtenu un produit hydrosoluble, par action du lysozyme sur les parois intactes de M.Smegmatis, possédant une forte activité adjuvante.

Parallèlement, l'activité biologique d'autres fractions de mycobactéries a été l'objet d'investigations poussées.

De nombreux travaux décrivant l'immunisation expérimentale des animaux contre la tuberculose, par les parois des mycobactéries, ont été publiés (24 à 27).

Selon Youmans et Youmans la même protection peut être conférée aux animaux par une préparation d'acide ribonucléïque de mycobactéries (28).

Il a été suggéré que l'immunité acquise à l'égard de Mycobacterium tuberculosis est du type cellulaire (29, 30).

Une autre caractéristique de ce type d'immunité serait l'augmentation de la résistance de l'animal aux différentes autres infections. Ainsi, les animaux préalablement infectés ou immunisés avec les mycobactéries atténuées, ou leurs extraits, résistent à la contamination par les Staphylococcus (31), Klebsiella (32), Salmanella (33) ou Brucella (34).

Fox et coll. en 1964 (35) décrivent la stimulation de la résistance non spécifique chez la souris par une préparation purifiée des parois de M.plei. En 1966, les mêmes auteurs (36) isolent à partir des parois de la même souche, une fraction hydrosoluble capable de protéger la souris contre l'infection par Salmanella enteritidis et dépourvue d'effets toxiques.

Misaki immunise avec une préparation de parois ou du mucopeptide qui en fait partie, les souris contre l'infection par les Staphylococcus (37).

Une immunisation par les parois de M.tuberculosis des souris contre les Salmonella est décrite par Ribi et coll. (27)

Des résultats similaires (protection contre Klebsiella par les parois de $H_{37}R_v$, Mycobacterium Kansasii et Mycobacterium Smegmalis) ont été récemment rapportés par E. Lederer (38) (expériences de L. Chedid et Lamensans).

L'immunité non spécifique conférée par le BCG est mise à profit dans le traitement des tumeurs expérimentales (39, 40, 41) et en clinique dans le traitement des leucémies (42). Récemment, Zbar a signalé la régression des tumeurs chez les cobayes après l'administration des parois du BCG (43).

Le BCG a un effet similaire sur les leucémies lymphoïdes chez les souris [Expériences inédites de L. Chedid et Lamensans (38)] et Bekierkunst observe un effet spécifique du BCG sur la croissance des tumeurs (44).

Ce bref aperçu explique l'intérêt porté aux parois, par de nombreuses équipes de chercheurs.

Au moment où nous avons entrepris ce travail, la composition des parois de mycobactéries était connue grâce aux publications de Cummins et Harris (45). Ces auteurs, dans le cadre d'une étude taxonomique analysent les parois de plusieurs souches d'Actinomycétales.

Takeya en 1963(46b) au cours d'un examen des parois de M.phlei au microscope électronique, signale l'existence de fibrilles à la surface, et déduit de ces expériences, que cet aspect fibreux est dû aux lipides. Il étudie également la composition des parois de cette souche et leur comportement vis-à-vis des différents enzymes protéolytiques et du lysozyme.

En 1966, Misaki étudie le mucopeptide et les polysaccharides des parois du BCG, il propose une structure partielle des polysaccharides (37, 47).

Le travail que nous allons exposer porte sur les parois de Mycobacterium tuberculosis var.hominis.

En premier lieu, nous décrirons plusieurs méthodes de dégradations partielles effectuées afin de dissocier les différents constituants des parois avant d'en préciser la structure.

Nous étudierons ensuite la structure du lipopolysaccharide (mycolate d'arabinogalactane) et du glucane.

Nous mentionnerons l'existence dans nos préparations d'une lipoprotéine, d'un lipide à ornithine, et d'un polymère d'acide glutamique. Nous parlerons ensuite de l'origine des "lipides liés". Enfin, nous étudierons l'influence de la D-cyclosérine sur la biosynthèse des Cires D, peptidoglycolipides macromoléculaires, produits d'autolyse des parois.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I

PREPARATION DES PAROIS

I. Isolement - Délipidation

Les souches étudiées de Mycobacterium tuberculosis $H_{37}R_v$ et $H_{37}R_a$ ont été cultivées sur milieu de Sauton pendant 4 semaines à 37°C. Les bactéries tuées par le phénol, sont filtrées et lavées abondamment à l'eau distillée.

Les cellules sont ensuite homogénéisées dans l'eau salée* et cassées avec la presse de French (2 passages à 4°C). Certains lots de bacilles sont désintégrés par sonnage. Les corps bacillaires intacts sont séparés par centrifugation à 2.500 t/minute. La solution surnageante est alors centrifugée à 12000t/minute; ce traitement permet d'obtenir les parois brutes. Elles sont ensuite délipidées par les solvants organiques, à la température ambiante, d'abord par l'acétone puis par les mélanges d'alcool-éther (1:1 v/v) et de chloroforme-méthanol (2:1).

II. Purification

Cummins et Harris en 1958 (45) lors d'une étude taxonomique sur les parois cellulaires d'Actinomycètes signalaient comme acides aminés principaux: la D- et L-alanine, l'acide D-glutamique et l'acide diaminopimélique accompagnés de faibles quantités de glycine et d'acide aspartique.

Or, l'examen des parois après délipidation présente en plus des acides aminés indiqués par ces auteurs, de la valine, de la phénylalanine, de la leucine, de la thréonine et de la sérine.

Les parois semblent donc contaminées par des résidus pro-

*Solution de NaCl à 5%.

téiniques. L'élimination de ces derniers par les enzymes protéolytiques a été décrite en premier lieu par Avery et Dubos (48).

A. Traitement par les enzymes protéolytiques

Parmi tous les procédés utilisant un traitement enzymatique, deux seulement ont été retenus:

a - les parois sont incubées avec la pronase (solution à 10%) enzyme protéolytique de Streptomyces griseus, dans un tampon phosphate à pH = 7,8 pendant 48 heures à 37°C. Le résidu de la digestion enzymatique est séparé par filtration sur verre fritté et lavé abondamment à l'eau distillée et à l'acétone.

b - les parois sont mises en suspension dans un tampon phosphate 0,01M à pH = 7,8 avec la trypsine Difco (49), à 37°C pendant 2 heures, le résidu est lavé plusieurs fois avec le tampon et à l'eau distillée.

Des échantillons obtenus par les deux procédés sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 6N et analysés sur colonne échangeuse d'ions, selon Moore et Stein, méthode modifiée par Piez et Morris (50, 51); les résultats figurent dans le tableau I.

Tableau I	Parois $H_{37}R_a$ traitées par la pronase	Parois $H_{37}R_a$ traitées par la trypsine
Acides aminés		
Acide glutamique	1,6	1,2
Alanine	2	2
Dpm	1,3	1
Aspartique	0,6	0,5
Glycine	0,8	0,6
Acide muramique*	0,5	0,5
Glucosamine*	0,5	0,6

* Les valeurs des sucres aminés ne sont pas corrigées

Toutefois, environ 5% d'autres acides aminés tels que valine, leucine, phénylalanine, sérine et thréonine sont toujours présents.

Ces deux méthodes ont donné des résultats comparables.

B. Aspect morphologique

Les préparations des parois $H_{37}R_a$ délipidées et purifiées ont été examinées au microscope électronique, par le Professeur André (Laboratoire de Biologie cellulaire, Faculté d'Orsay).

Les coupes des parois figurent page 9, les techniques employées sont les suivantes: *

Fixation: Glutaraldéhyde: 0,5% dans tampon phosphate sodique 0,05M.
O_sO_4: 2% dans le même tampon.

Microinclusion: selon Charret et Fauré-Fremiet (182)
Caillot de fibrinogène

Déshydratation: Echelle croissante d'éthanol suivie d'oxyde de propylène

Inclusions en Epon selon Luft (183)

Contraste des coupes: Acétate d'uranyle 5% aqueux suivi de citrate de plomb selon Reynolds (184).

---

* Nous remercions Madame Balmefrezol pour le travail qu'elle a bien voulu effectuer pour nous.

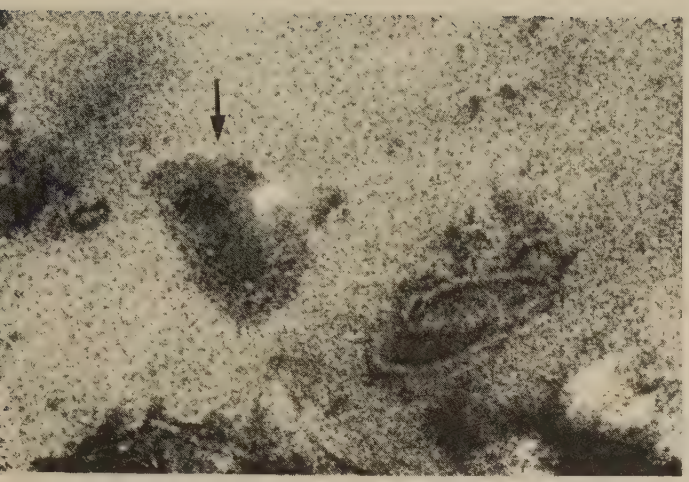


Fig. 1

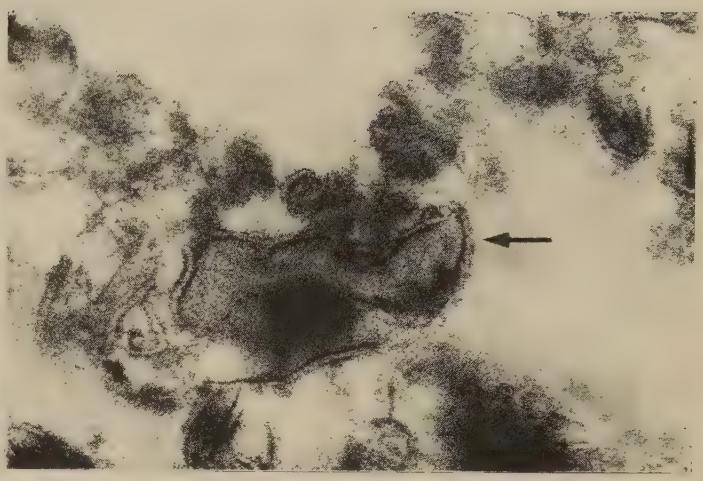


Fig. 2

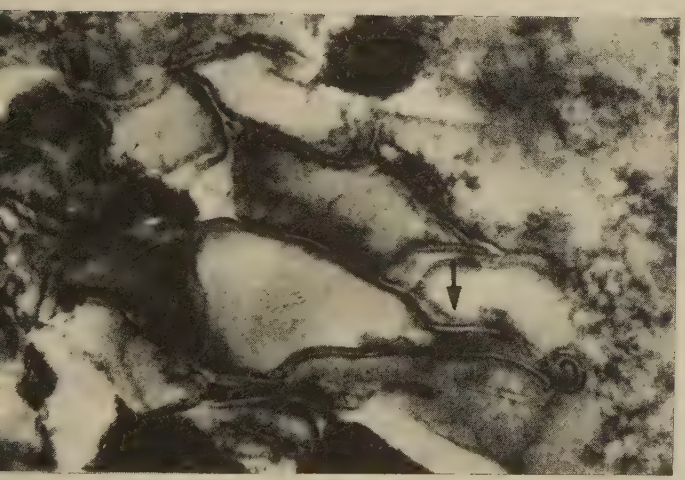


Fig. 3a

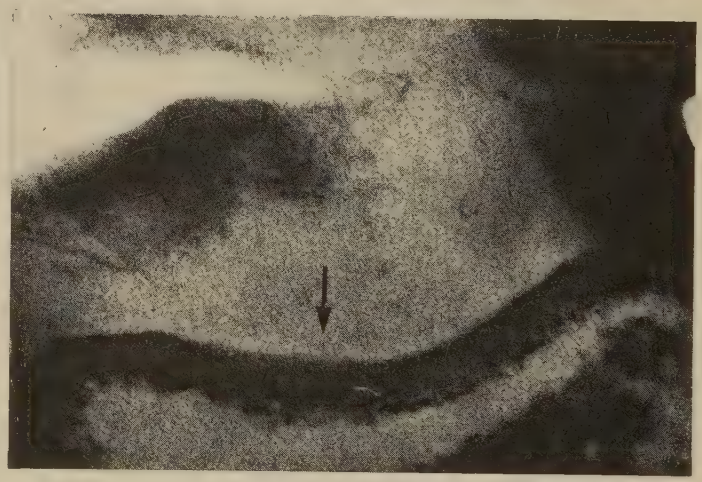


Fig. 3b

Fig. 1, 2, 3: Coupe des parois $H_{37}R_a$, délipidées, et traitées par les enzymes proteolytiques.

Dans la Fig. 3b on peut distinguer les couches multiples.

Grossissements: 1 = 120.000
2 = 120.000
3a = 60.000
3b = 90.000

C. Etude des constituants des parois de $H_{37}R_v$ et $H_{37}R_a$.

L'hydrolyse ménagée par l'acide chlorhydrique 2N suivie de l'extraction par l'éther permet d'obtenir deux phases: éthéro et hydrosoluble. La chromatographie sur papier de cette dernière met en évidence la présence des sucres réducteurs: arabinose, galactose, et glucose.

La fraction éthérée concentrée et méthylée par la diazométhane est chromatographiée sur couche mince dans le solvant R. Elle contient surtout un mélange d'acides mycoliques (R_f = 0,32, R_f = 0,27).

Les sucres aminés sont identifiés après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 3N selon la méthode de Moore et Stein, à l'aide de l'autoanalyseur Beckman. Par ailleurs, la chromatographie sur papier dans le solvant A, permet l'identification de l'acide muramique et de la glucosamine (la galactosamine se trouve à l'état de traces). Les proportions molaires des sucres aminés indiquent le rapport 1:1.

Le dosage par la méthode de Calkins (169) montre qu'une molécule d'acide muramique sur trois est N-glycolylée. Le reste se trouve sous forme N-acétylée.

L'hydrolyse acide totale par l'acide chlorhydrique 6N, des parois, libère les acides aminés qui figurent dans le tableau II.

Nous indiquons la composition des parois de M.tuberculosis souche $H_{37}R_v$, $H_{37}R_a$ dans le tableau II.

Nous avons ainsi confirmé les travaux antérieurs qui montraient tous la grande complexité des parois des mycobactéries. Trois types de constituants semblent en faire partie: lipides, polysaccharides et peptides. La présence d'acides aminés supplémentaires suggère l'existence de protéines.

Après avoir identifié ces différents constituants des parois de M.tuberculosis variété hominis, nous avons cherché à déterminer leur enchaînement.

Pour ce faire, nous nous sommes inspirés des méthodes de dégradations partielles utilisées par différents auteurs dans leur étude des parois bactériennes.

Tableau II

Composition des parois de $H_{37}R_v$, de $H_{37}R_a$ (souches humaines virulente et avirulente de M.tuberculosis)

	Acides aminés*	%	Osamines	%	Sucres neutres	%	Acides gras	%
Parois $H_{37}R_v$	DAP, Ala, Glu 1 2 2 Gly 0,2 Asp 0,2	15	glucosamine Acide muramique	8	Ara, Gal, 5 moles/2moles traces de Glu	28	Acides mycoliques	20 à 25
Parois $H_{37}R_a$	DAP, Ala, Glu 1 2 1 Asp 0,5 Glycine 0,6	20	glucosamine 0,5 Acide muramique 0,5	10	Ara, Gal Glu 3:1:3	20 à 25	Acides mycoliques	20 à 25

*Les préparations étudiées contiennent toujours environ 5% d'acides aminés contaminants, surtout: Valine, Phénylalanine, Leucine, Thréonine, Sérine.

Ainsi nous avons employé:

1) l'extraction par le chlorure de phénylhydrazine, utilisée par Archibald dans le cas des parois de Staphylococcus aureus, et de Bacillus Subtilis (52).

2) l'extraction par le phénol adoptée par Westphal et son école pour l'étude des lipopolysaccharides d'E.Coli, et par Clarke aux Pseudomonas aeruginosa (53, 54).

3) l'oxydation periodique des parois selon Misaki et coll. Ces auteurs avaient ainsi traité les parois du mycobacterium bovis (BCG) (37).

4) l'hydrolyse alcaline des parois toujours selon les mêmes auteurs japonais (47).

5) l'extraction par l'acide trichloroacétique mise au point au laboratoire

6) l'acétolyse des parois selon le procédé adopté par Aspinall (55) dans l'étude des polysaccharides.

CHAPITRE II

DEGRADATION DES PAROIS

I. Extraction par le chlorhydrate de phénylhydrazine (52)

Le traitement par le chlorhydrate de phénylhydrazine en solution dans l'acétate de sodium nous a fourni un mucopeptide insoluble. Mais l'analyse quantitative des sucres effectuée sur ce résidu d'extraction indique la présence de 6,4% d'oses neutres.

II. Extraction par le phénol (54)

Le traitement par le phénol rend le lipopolysaccharide soluble dans la phase aqueuse, le peptidoglycane ou mucopeptide reste insoluble, quant aux protéines elles sont solubilisées par le phénol.

Nous avons alors traité les parois $H_{37}R_V$ par le phénol à 45%, à 70°C pendant 30 minutes. Après centrifugation le résidu insoluble est lavé abondamment à l'eau et à l'acétone. Les phases aqueuse et phénolique sont séparées et leur contenu analysé.

1.- Le résidu insoluble.- Le dosage des sucres effectué sur ce résidu montre qu'il contient encore 12% d'oses. Le polysaccharide n'est donc pas entièrement extrait. Rappelons que les parois purifiées contiennent 25% d'oses neutres.

Quant aux sucres aminés, la préparation ne contient que des traces d'acide muramique. Le mucopeptide semble donc subir une dégradation dans ces conditions (voir tableau IV).

En revanche, l'examen du tableau IV indique une quantité relativement importante d'acide glutamique. Il proviendrait de

l'hydrolyse de son polymère dont nous reparlerons plus tard.

L'abondance d'acide glutamique dans les souches de M.tuberculosis virulentes a été déjà signalée par Migliore et coll. (56). D'autre part, l'isolement d'acide polyglutamique à partir d'une souche de M.tuberculosis variété hominis, "Peurois" ainsi que du BCG a été rapporté récemment par Vilkas et coll.(57) et Wietzerbin et coll.(58).

2.- La phase phénolique.- Elle contient une protéine ou lipoprotéine que nous isolons par précipitation à froid,au moyen de méthanol à partir de la solution phénolique.

Elle est examinée après hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique sur autoanalyseur Beckman.

Sa composition figure dans le tableau III

Constituants	µ moles par mg	Rapport molaire approximatif	%
Acide aspartique	0,203	2,5	10,24
Thréonine	0,105	1,3	5,32
Sérine	0,098	1,2	4,91
Ac.glutamique	0,258	3,2	13,11
Glycine	0,215	2,6	10,65
Alanine	0,288	3,6	14,75
Proline	0,123	1,5	6,14
Valine	0,168	2,1	8,60
Leucine	0,193	2,4	9,83
Tyrosine	0,026	0,3	1,22
Phénylalanine	0,078	1	4,09
Arginine	0,117	1,4	5,73
Lysine	0,026	0,3	1,22
Mistidine	0,076	1	4,09

Tableau III

3.- La phase aqueuse.- La solution aqueuse est dialysée et lyophilisée, son hydrolyse suivie de chromatographie sur papier permet d'identifier surtout l'arabinose et le galactose.

Les résultats obtenus par les deux traitements ci-dessus, à savoir l'extraction incomplète des polysaccharides accompagnée de dégradation partielle du mucopeptide (disparition d'acide muramique) nous ont fait abandonner ces méthodes.

III. Oxydation periodique (37)

Afin d'isoler la fraction mucopeptidique intacte, nous avons essayé de dégrader les polysaccharides par oxydation periodique.

La préparation de parois $H_{37}R_v$ en suspension dans le métapériodate de sodium est abandonnée à l'obscurité pendant 14 jours à la température ambiante. Après centrifugation et plusieurs lavages à l'eau, le résidu est réduit par le borohydrure de sodium, dans l'eau pendant une nuit. Le surnageant est séparé par centrifugation et le culot est hydrolysé par SO_4H_2 0.1N pendant 24 heures à 20°C. L'insoluble est ensuite isolé, la solution est concentrée, puis chromatographiée sur papier dans le solvant G. Elle contient du glycérol R_f = 0,66, du thréitol R_f = 0,50 et de l'arabinose R_f = 0,26. Les acides aminés faisant partie du mucopeptide n'ont pas été décelés.

Le mucopeptide obtenu par ce traitement semble intact, les proportions respectives des constituants sont caractéristiques des parois bactériennes (voir tableau IV). Toutefois, la teneur en acide glutamique est plus élevée (par rapport au Diaminopimélique), cet acide aminé pourrait provenir, comme nous l'avons signalé plus haut, d'un polymère.

Le mucopeptide ainsi obtenu est solubilisé aisément par le lysozyme (voir p. 61).

Parois $H_{37}R_v$

Constituants	(1) µ moles	(1) Rapport molaire approximatif	(2) µ moles	(2) Rapport molaire approximatif
Acide glutamique	176	2	73,9	2
Alanine	120	1,3	64,4	1,85
Dpm	78,8	1	33	0,95
Acide Aspartique	30,9	0,4	traces	
Glycocolle	32,6	0,4	6,6	0,09
Glucosamine	56,1	0,7	28,9	0,8
Ac. muramique	traces		10,5	0,65

Tableau **IV**: Composition des résidus

(1) obtenu par extraction au phénol

(2) obtenu par oxydation periodique des parois

IV. Hydrolyse alcaline (47)

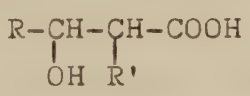
Les polysaccharides et les lipides faisant partie des parois peuvent être séparés par l'hydrolyse alcaline selon Misaki et coll.

Les parois $H_{37}R_a$* sont traitées par la soude normale à 70° pendant 14 heures, sous atmosphère d'azote. Après centrifugation la solution est acidifiée par l'acide acétique et extraite par l'éther. Le résidu est également extrait par l'éther et le chloroforme.

Etude des produits de saponification

1. Fraction éthérosoluble

Les phases organiques sont réunies, le solvant concentré sous vide et le produit méthylé par le diazométhane est chromatographié sur couche mince de Silicagel G dans le solvant R (59) en présence d'échantillon authentique d'esters mycoliques. Après révélation spécifique à la rhodamine, deux taches bien distinctes dont les R_f respectifs sont 0,27 et 0,32 sont observées. Il s'agit d'un mélange d'acides mycoliques PF: 58-60°C, β-hydroxylés, α-ramifiés qui correspondent à la formule générale:



Ils représentent 25% par rapport au poids sec des parois.

2. Fraction hydrosoluble

La fraction hydrosoluble obtenue par hydrolyse alcaline des parois est séparée du résidu insoluble, puis débarrassée des sels de sodium, par dialyse contre l'eau, à 4° pendant 48 heures, ou par filtration sur Biogel P_{10}.

Cette fraction se compose de sucres neutres: arabinose,

---

* Ne disposant plus de la souche de M.tuberculosis variété hominis $H_{37}R_v$, la suite de ce travail porte sur l'étude de son mutant avirulent $H_{37}R_a$ cultivé dans le Service de Microbiologie de notre Institut.

galactose, glucose; d'acides aminés: alanine, acide aspartique Dpm, acide glutamique; des sucres aminés: acide muramique et glucosamine; et enfin, d'acide phosphorique.

Cette partie hydrosoluble est fractionnée par précipitation au moyen d'éthanol. La première fraction précipitée par 25% d'éthanol fournit après hydrolyse acide uniquement du glucose. Elle est donc constituée par un glucane. Le même polysaccharide a pu être obtenu par une méthode différente à partir des parois intactes (60b). Il constitue 4-5% par rapport au poids sec des parois. Nous le décrivons page 57.

Les fractions suivantes (30 à 60% d'éthanol) sont composées d'arabinose et de galactose: c'est l'arabinogalactane, qui constitue l'élément essentiel des polysaccharides des parois et des Cires D (60 a et b, 61, 62 et 47).

3. Le résidu

Le résidu est analysé qualitativement après hydrolyse acide (6N), il contient tous les acides et sucres aminés du mucopeptide.

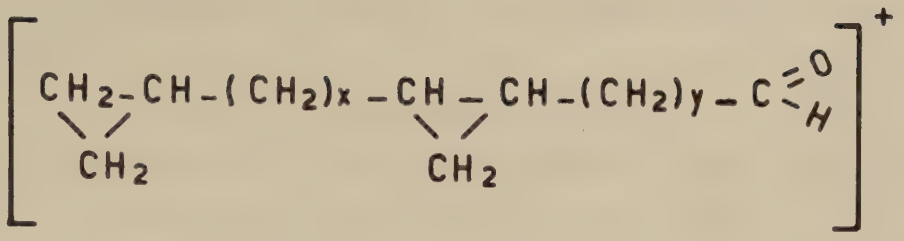
Spectrométrie de masse des esters mycoliques

Les pics des différents homologues composant le mélange ne sont pas décelés sur le spectre. Cependant, nous trouvons des pics à (M-50) correspondant à la perte simultanée d'une molécule d'eau et de méthanol, à partir des acides répondant à la formule brute:

$C_{76}H_{148}O_3$; $C_{80}H_{156}O_3$; $C_{82}H_{160}O_3$

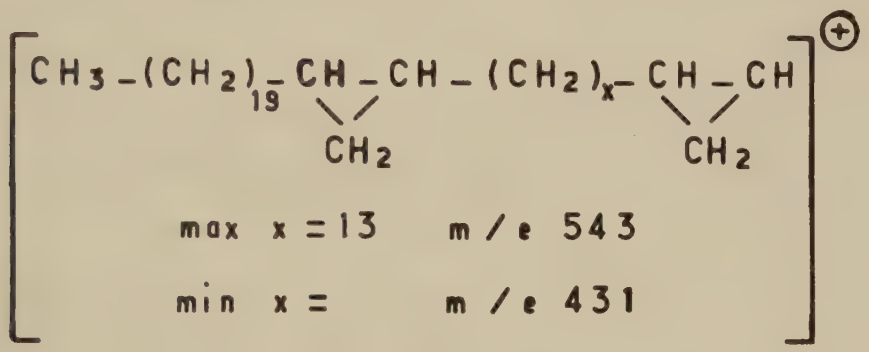
Le pic intense à m/e 410 correspond à l'acide hexacosanoïque méthylé formé à partir de la chaîne latérale $C_{24}H_{49}$, caractéristique des souches de M.tuberculosis var.hominis (63, 13b, 64).

Les pics homologues à m/e 431, 459, 487, 515 et 543 sont des fragments isobares, les uns sont formés par la perte de 281 unités de masse ($C_{20}H_{41}$) à partir du méroaldéhyde A:



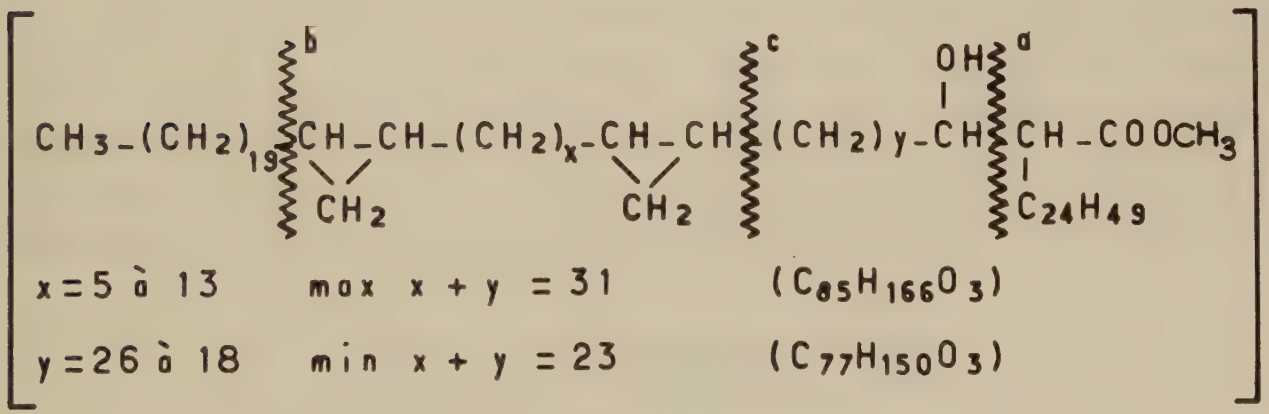
max x + y = 31 m/e = 543 min x + y = 23 m/e 431

les autres sont obtenus par scission de l'acide mycolique (voir formule) selon C



Signalons que Goldman et coll. ont également identifié le même type d'acides mycoliques, comprenant 2 cyclopropanes dans la souche $H_{37}R_a$ (65).

L'examen du spectre de masse de ces esters mycoliques permet de leur attribuer la structure suivante:



Les principales coupures sont rapportées dans le tableau ci-dessous:

Tableau V

Pics m/e caractéristiques du spectre de masse des esters méthyliques des acides mycoliques

Ions	Iere série	IIe série
Méthylmycolates -50	1072-1156	
Méromycolal	796	
Méroaldéhydes-281	431-543	
Hexacosanoate de méthyle	410-410	410-410
Fragments isobare des méromycolals	515	
Fragment 1		325-325
Fragment 2		307-335

Dans la partie inférieure du spectre nous observons des pics à m/e 307, 325, 335. Ils pourraient être attribués aux fragments suivants:

fragment 1 contenant le méthoxyle: m/e 325 ($C_{22}H_{45}O$)

fragment 2 : m/e 307 et 335 $\underset{\underset{OCH_3}{|}}{CH}-(CH_2)_y-\underset{\diagdown\,\diagup}{CH}-\overset{+}{CH}$ avec perte d'un proton, y = 16 et y = 18.
$\qquad\qquad\qquad

Les principales coupures sont rapportées dans le tableau ci-dessous:

Tableau V

Pics m/e caractéristiques du spectre de masse des esters méthyliques des acides mycoliques

Ions	Iere série	IIe série
Méthylmycolates -50	1072-1156	
Méromycolal	796	
Méroaldéhydes-281	431-543	
Hexacosanoate de méthyle	410-410	410-410
Fragments isobare des méromycolals	515	
Fragment 1		325-325
Fragment 2		307-335

Dans la partie inférieure du spectre nous observons des pics à m/e 307, 325, 335. Ils pourraient être attribués aux fragments suivants:

fragment 1 contenant le méthoxyle: m/e 325 ($C_{22}H_{45}O$)

fragment 2 : m/e 307 et 335 $\underset{\underset{OCH_3}{|}}{CH}-(CH_2)_y-\underset{\diagdown\,\diagup}{CH}-\overset{+}{CH}$ avec perte d'un proton, y = 16 et y = 18.
$\qquad\qquad\qquad

dans B),et le galactose (R_f = 0,16 dans A, R_f = 0,33 dans B).

Les deux oses sont dosés par la méthode de Wilson (66) après leur séparation chromatographique dans le système de solvant C et élution du papier. Ils se trouvent dans le rapport molaire 2:1.

- L'hydrolyse douce par l'acide sulfurique 0,01N libère uniquement de l'arabinose, ce qui indique sa position terminale et se trouve en accord avec sa présence sous une forme furannosique.

- D'autre part, l'hydrolyse acide totale de l'arabinogalactane et la chromatographie de l'hydrolysat dans le solvant A permettent de déceler de faibles quantités d'acides aminés caractéristiques des parois à savoir: l'acide diaminopimélique, l'acide glutamique, l'alanine, la glycine et l'acide aspartique.

Nous n'avons pas réussi à débarrasser nos préparations de ces constituants aminés.

a. Oxydation periodique

L'oxydation periodique par le métaperiodate de sodium 0,05M effectuée sur le polysaccharide permet de retrouver l'arabinose intact. La quantité de sucres non oxydés est de 30%.

L'oxydation periodique suivie de réduction par le borohydrure de sodium et d'hydrolyse acide indique, après chromatographie sur papier dans le solvant B, la présence d'arabinose intact, de glycérol et de thréïtol.

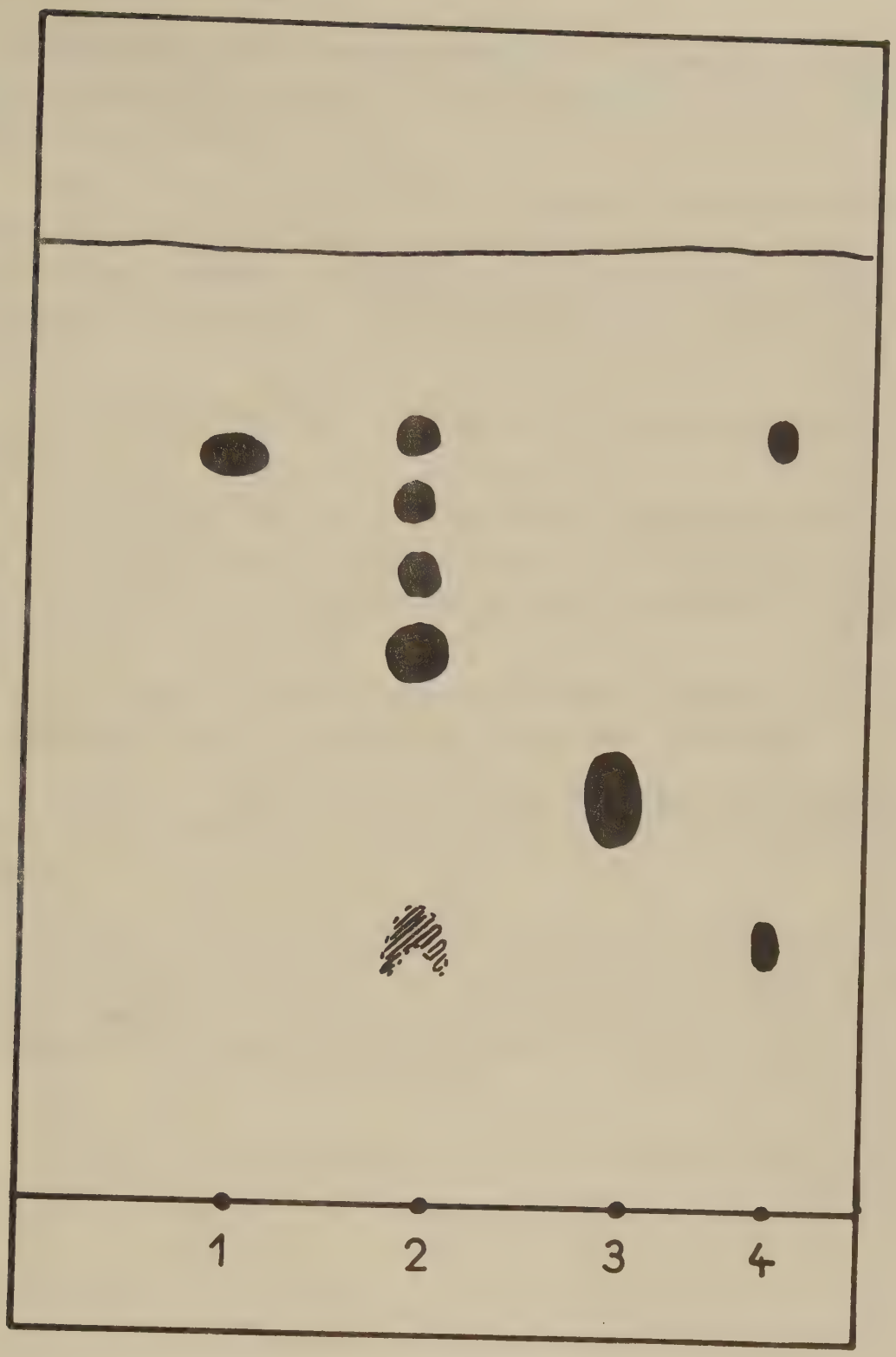
b. Perméthylation

Le polysaccharide a été perméthylé selon la méthode d'Hakomori. La substance perméthylée(dont le spectre IR ne présente plus de bande OH) est, soit:

- hydrolysée et le produit d'hydrolyse chromatographié sur plaque de Silicagel G dans le solvant T (voir Fig. 4).

- méthanolysée et chromatographiée en phase gazeuse en présence de témoins authentiques.

Fig. 4



Dérivés perméthylés de l'arabinogalactane identifiés par chromatographie sur couche mince

1: glucose perméthylé

2: arabinogalactane perméthylé et hydrolysé
2,3,5-tri-OMe-ara
2,5-di-OMe-ara
2,3,5-tri-OMe-gal
2,3-di-OMe-ara
mono-Me-ara

3: 2,3,4-tri-O-méthylgalactose

4: 2,3,5-tri-O-méthylarabinose, mono méthyl-arabinose

- hydrolysée, réduite et peracétylée. Les dérivés peracétylés sont chromatographiés en phase gazeuse (colonne: ECNSS sur Chromosorb Q) (68).

Une révélation spécifique a apporté des renseignements supplémentaires quant à la substitution des oses en 2. Ainsi, un dérivé monométhylé d'arabinose donnant un test négatif sur papier avec le chlorure de triphényltétrazolium, est substitué en 2 (69).

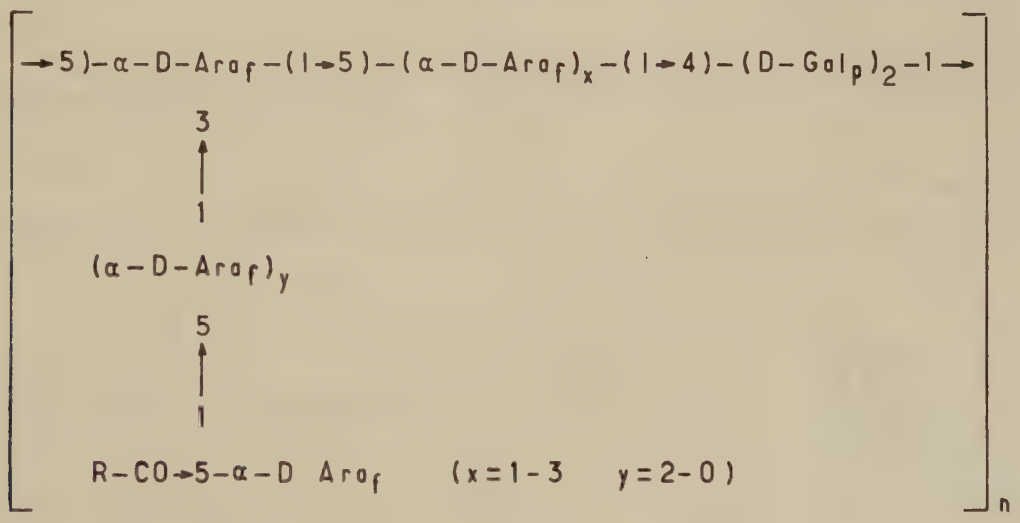
Les dérivés méthylés obtenus sont indiqués dans le tableau VI.

L'obtention du 2,3,5-tri-O-méthylarabinofurannose indique la position terminale non réductrice de cet ose. Les proportions de 2,3-di-O-méthylarabinofurannose suggèrent la quantité prépondérante de liaisons 1-5.

L'isolement d'un dérivé monométhylé d'arabinose: le 2-O-méthylarabinose indique une structure ramifiée.

Quant au temps de rétention du dérivé triméthylé du galactose, il correspondrait à celui d'un 2,3,6-tri-O-méthylgalactopyrannose.

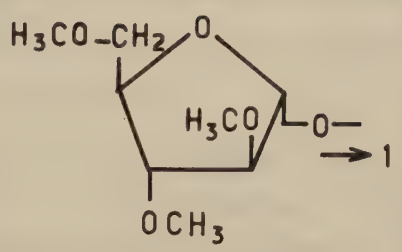
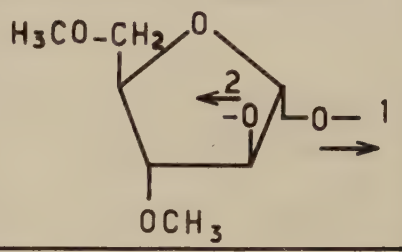
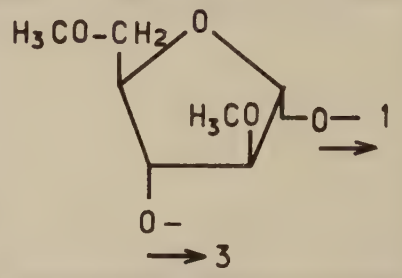
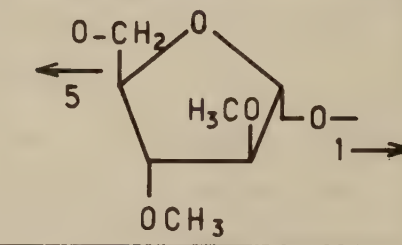
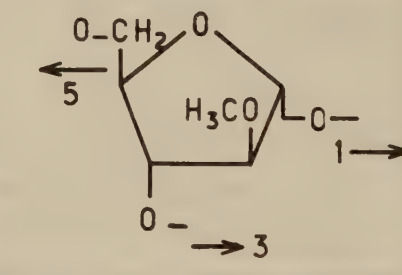
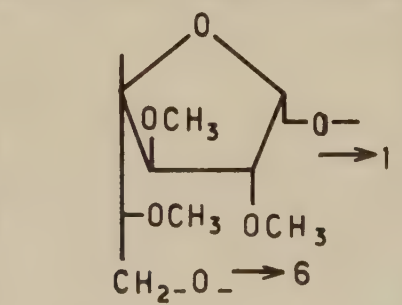
Les résultats de la perméthylation (60) étaient en accord avec ceux obtenus au cours de l'oxydation periodique et semblaient confirmer la structure de l'arabinogalactane des parois de différentes souches de Mycobactéries proposée par Misaki et



R C O: Résidu d'acide mycolique

D-Araf = D-arabinofurannose D-Galp = D-galactopyrannose

Fig. 5 formule de Misaki

Méthyl glycosides de	Proportions	Liaisons possibles
2, 3, 5-tri-O-méthyl-arabinofurannose	1	
3, 5-di-O-méthyl-arabinofurannose	2,3	
2, 5-di-O-méthyl-arabinofurannose	0,7	
2, 3-di-O-méthyl-arabinofurannose	7,2	
2-O-méthyl-arabinofurannose	1	
2, 3, 5-tri-O-méthyl-galactofurannose	5,2	

Dérivés méthylés de l'arabinogalactane

Tableau VI

coll.(47) (voir formule page 23) et de celle des Cires D (61) étudiée dans notre laboratoire.

En effet, le glycérol obtenu provient de l'arabinofuranno-se terminal et de l'arabinofurannose substitué en 5.

L'arabinose intact correspondrait aux arabinofurannoses substitués en 3 ou en 2, ainsi qu'aux pentoses bisubstitués, tandis que le thréïtol serait formé par l'oxydation du galactopyrannose dont la liaison glycosidique serait en 4.

Ajoutons que l'obtention du thréïtol est compatible également avec la présence du galactofurannose substitué en 5 ou 6.

Les expériences ultérieures démontreront que les parois des mycobactéries comme également les Cires D, contiennent du galactose sous forme furannosique.

V. Hydrolyse acide ménagée

L'hydrolyse alcaline nous a permis d'obtenir l'arabinogalactane intact. Afin de confirmer le mode d'enchaînement de ces constituants, nous avons cherché un moyen permettant d'obtenir les fragments contenant un nombre limité d'oses.

Une méthode de dégradation partielle des parois est alors utilisée. Il s'agit de l'hydrolyse acide ménagée au moyen de l'acide trichloroacétique à 10%, à chaud. Ce traitement fournit la fraction soluble dans la solution acide et le résidu insoluble (voir schéma 1).

Les deux fractions sont extraites successivement par l'éther et le chloroforme bouillant. Les phases organiques sont réunies et concentrées. L'étude du produit obtenu sera rapportée plus loin.

Examen de la fraction hydrosoluble

Cette fraction est lyophilisée et le résidu débarrassé de l'acide trichloroacétique par des extractions répétées au moyen de l'éther.*

* L'acide trichloroacétique n'est jamais entièrement éliminé à partir de sa solution aqueuse, d'où la nécessité de ce traitement.

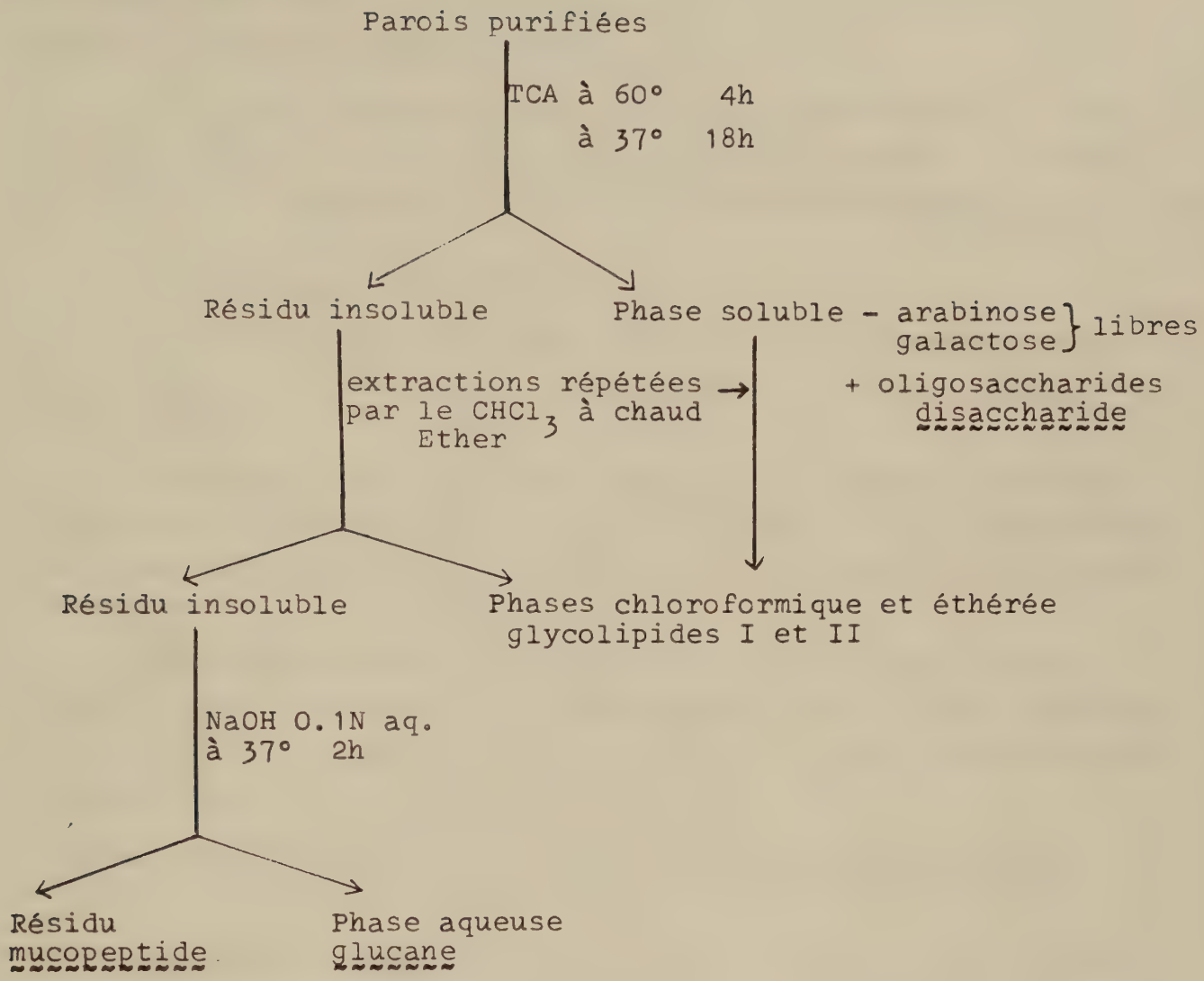

Parois purifiées
TCA à 60° 4h
à 37° 18h
Résidu insoluble
Phase soluble - arabinose } libres
galactose }
extractions répétées par le CHCl3 à chaud
Ether
+ oligosaccharides
disaccharide
Résidu insoluble
Phases chloroformique et éthérée
glycolipides I et II
NaOH 0.1N aq.
à 37° 2h
Résidu
mucopeptide
Phase aqueuse
glucane

Schéma 1

Son examen chromatographique (sur papier, dans le solvant B) montre la présence d'arabinose et de galactose libres ainsi que de plusieurs oligosaccharides (voir fig. 6).

Par chromatographie préparative sur papier dans le même solvant, nous avons pu isoler un disaccharide ayant la vitesse de migration $R_{tréhalose} = 1$ et un trisaccharide $R_{tréhalose} = 0,82$.

A. Etude du disaccharide

- Il se présente sous forme de poudre incolore $[\alpha]_D = -26° \pm 2$, (H_2O, c = 0,4), son point de fusion: 170-175°C (avec décomposition).

- Sa vitesse de migration ainsi que les dosages des sucres réducteurs présents avant et après réduction par le borohydrure de sodium suggèrent qu'il s'agit d'un disaccharide, l'intensité d'absorption diminuant de 45% environ.

- Son hydrolyse acide fournit uniquement du D-galactose $[\alpha]_D = +80°C$, identifié par chromatographie sur papier (solvant A: $R_f = 0,16$, solvant B: $R_f = 0,33$). Il s'agit donc d'un digalactoside.

Preuves expérimentales excluant la structure gal_p 1-4 gal_p

- Comme nous l'indiquons plus haut, le pouvoir rotatoire du digalactoside isolé est $[\alpha]_D = -26° \pm 2°$, il est donc différent de celui du 4-O-β-D-galactopyrannosyl-D-galactopyrannose: $[\alpha]_D$ $+186 \longrightarrow +173°$ (72).

- La vitesse de migration du digalactoside sur papier, tout en étant identique à celle du digalactopyrannoside 1-4 dans le solvant O (voir tableau VII) est plus rapide dans les solvants D, L et B. Elle est voisine d'un 6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose décrit par Plackett et Buttery (73).

- La réaction colorée sur papier avec un réactif contenant de l'aniline, de la diphénylamine et de l'acide phosphorique (77), diffère de celle obtenue avec le lactose et le maltose: ces deux disaccharides donnent la coloration bleu vif caractéristique de disaccharides à liaison 1-4, le digalactoside se

Fig. 6.- Séparation chromatographique des oligosaccharides obtenus par extraction avec le TCA, dans le solvant B.

1: arabinose, galactose
2: tréhalose, raffinose
3: phase aqueuse de TCA

Tableau VII

Disaccharides	B	O	D	L
Digalactoside de M.tuberculosis	0,80	0,42	0,77	0,38
6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose	0,77	-	-	0,37
4-O-α-D-galactofurannosyl-D-galactose (74) (75)	0,65	0,41	-	0,31
4-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose (76)	-	-	0,59	-

colore en vert gris.

- Signalons également que les essais enzymatiques avec l'α et β-galactosidase se sont avérés négatifs.

Ces propriétés excluent la liaison 1-4 entre deux galactopyrannoses.

Présence de cycle furannosique et détermination de la liaison glycosidique

Les expériences qui suivent apportent des arguments en faveur de la présence d'un cycle furannosique.

L'existence d'un galactofurannose non réducteur est indiquée par la facile hydrolyse en milieu acide dilué (81). En effet, le digalactoside soumis à l'action de l'acide sulfurique 0,01N à 85°C, pendant 90 minutes, libère 20% du galactose.

- Dégradation selon Gorin et Spencer (78)

Afin de confirmer la présence d'un galactofurannose et de déterminer la liaison entre les deux oses, nous avons utilisé la suite de réactions décrites par Gorin et Spencer pour caractériser le 5-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose isolé à partir du galactocarolose et par Plackett et Buttery (73) pour caractériser le 6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose isolé du galactane de Mycoplasma Mycoïdes (voir schéma de dégradation page 31 Fig. 7).

Les produits de l'oxydation periodique (4minutes) du digalactoside des parois, réduit, ont été, après réduction par $NaBH_4$ et hydrolyse, caractérisés par chromatographie sur papier; le seul sucre réducteur est l'arabinose; l'éthylène glycol et le glycérol sont également présents.

Leurs vitesses de migration sont indiquées dans le tableau VIII.

Tableau VIII

	A	B
Arabinose	0,24	0,4
Glycérol	0,63	0,72
Ethylène-glycol	0,50	0,55

L'arabinose est formé par oxydation entre les carbones 5 et 6 du galactofurannose non réducteur. En effet, dans le galactofurannosyl-galactitol, les deux carbones porteurs des hydroxyles trans (2 et 3) sont relativement résistants à l'oxydation periodique et le traitement de quatre minutes ne coupe que la chaîne latérale.

La formation d'éthylène-glycol suggère une liaison 1-6, mais celle du glycérol serait en faveur d'une liaison en 1-5.

Ce type de liaison pouvait également s'accorder avec les résultats rapportés précédemment. En effet, les dérivés obtenus

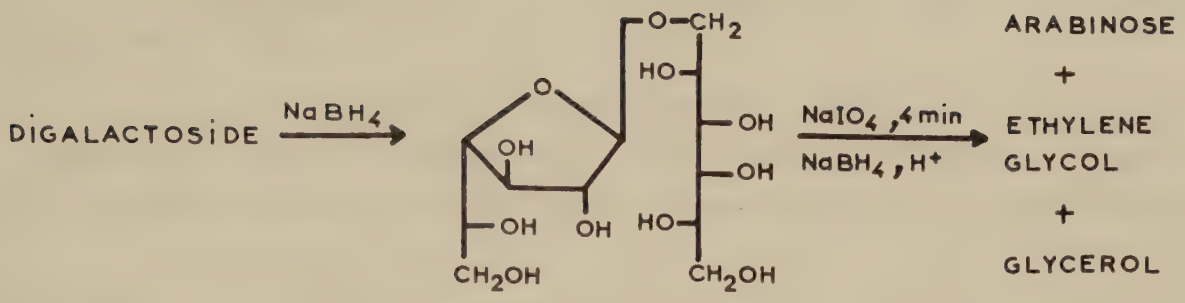


Fig. 7: Dégradation selon Gorin et Spencer

à partir d'un polysaccharide contenant les unités hexopyrannosiques liées en 1-4 peuvent être confondus avec ceux des hexofurannoses possédant des liaisons 1-5.

Nous nous sommes aperçus par la suite que les temps de rétention en chromatographie gazeuse sur colonne utilisée du 2,3,6-tri-O-méthylgalactopyrannose et 2,3,5-tri-O-méthylgalactofuranno-se sont pratiquement les mêmes [voir aussi (79)].

D'autre part, la révélation d'éthylène glycol au moyen de nitrate d'argent est beaucoup moins sensible que celle du glycérol.

La suite de ce travail montre que le disaccharide obtenu est bien le 6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose et le glycérol décelé parmi les produits de sa dégradation proviendrait de l'oxydation incomplète du galactitol.

Nous avons répété d'ailleurs la même expérience avec le 6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose authentique* et nous identifions les mêmes dérivés.

---

* Nous adressons nos remerciements au Dr. J.H. Buttery, Animal Health Laboratory, Parkville Victoria, Australia, pour cet échantillon.

- Perméthylation

Le digalactoside isolé est perméthylé selon la méthode d'Hakomori (67).

a Les dérivés obtenus après méthanolyse du produit perméthylé (qui ne présente plus de bandes OH dans le spectre infra-rouge) sont examinés par chromatographie en phase gazeuse.

Les temps de rétention indiqués dans le tableau IX sont exprimés par rapport au temps de rétention du 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-α-glucoside (T_G).

b Les produits obtenus après hydrolyse du digalactoside perméthylé sont examinés par chromatographie en couche mince dans le solvant T, voir Fig. 8. Trois spots sont identifiés en présence de témoins authentiques.*

2,3,5,6-tétra-O-méthyl-galactofurannose	R_{Glu} = 1,01
2,3,5-tri-O-méthyl-galactofurannose	R_{Glu} = 0,86
2,3,4-tri-O-méthyl-galactopyrannose**	R_{Glu} = 0,59

L'obtention de deux dérivés triméthylés suggère que l'unité réductrice existe aussi bien sous forme pyrannosique que furannosique. Ce mélange de deux formes cycliques pourrait se produire durant la perméthylation. Il est en effet connu (80) que la perméthylation peut conduire à la distortion de l'équilibre anomérique. D'autre part, la formation d'un cycle pyrannosique peut avoir lieu au cours de l'hydrolyse acide du polysaccharide.

- Chromatographie en phase gazeuse

Le digalactoside et son dérivé réduit au moyen de $NaBH_4$ sont chromatographiés en phase gazeuse, après pertriméthylsilylation (82).

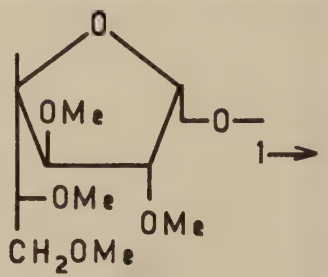
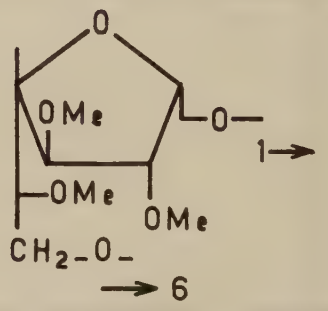
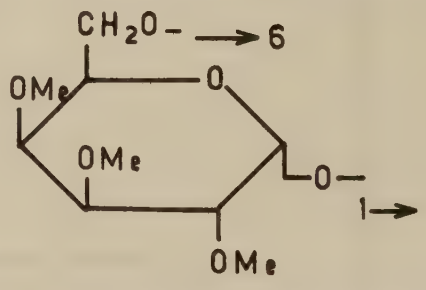
Le 6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose provenant du ga-

---

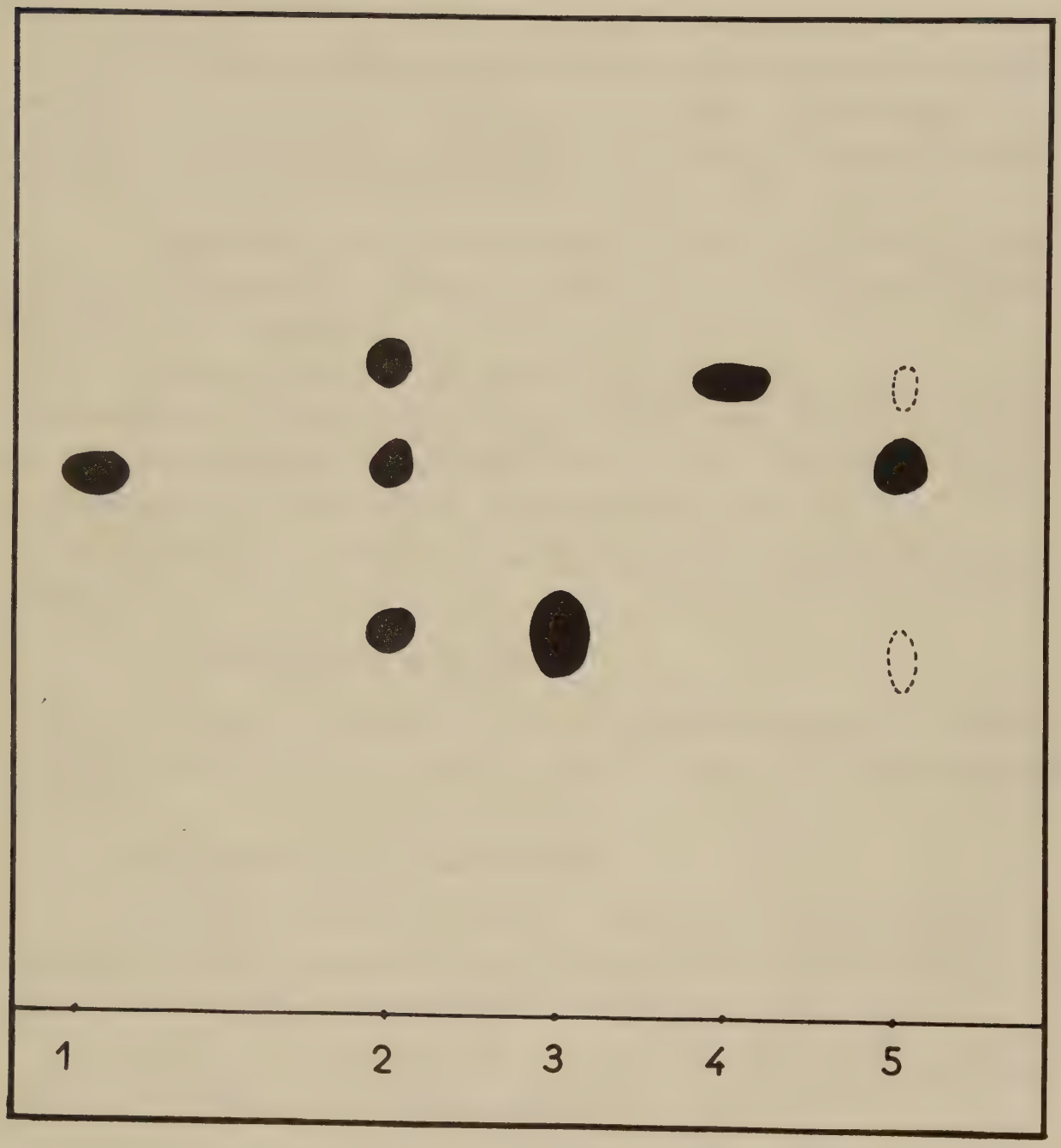
* Voir préparation des témoins page 108.

** Le 2,3,4-tri-O-méthyl-galactopyrannose nous a été aimablement fourni par Madame Markovits.

Tableau IX

Méthyl glycosides de.	T_G	Liaisons
2, 3, 5, 6-tétra-O-méthyl-galactofurannose	1,1	
2, 3, 5-tri-O-méthyl-galactofurannose	2,8	
2, 3, 4-tri-O-méthyl-galactopyrannose	4,5	

Dérivés méthylés du digalactoside



Dérivés perméthylés du digalactoside identifiés par chromatographie sur couche mince

1, 4, : arabinose, glucose perméthylés et hydrolysés

3, : 2, 3, 4-tri-O-méthylgalactose

2, : digalactoside perméthylé et hydrolysé { 2, 3, 5, 6-tétra-OMe-galactose
2, 3, 5-tri-OMe-galactose
2, 3, 4-tri-OMe-galactose

5, : galactose perméthylé et hydrolysé.

Fig. 8

lactane de Mycoplasma Mycoïdes, et le 5-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose isolé à partir du galactocarolose servent de témoins. Les temps de rétention sont indiqués par rapport au dérivé triméthylsilylé du sucrose.

La chromatographie du galactosyl-D-galactose triméthylsilylé (Fig. 9) montre un pic à R_s = 1,75 avec un épaulement et un second pic à R_s = 1,22, tandis que le dérivé du TMS-galactosyl-D-galactitol donne surtout un pic à R_s = 1,56.

L'épaulement est probablement dû à une des formes anomériques du disaccharide. Quant au pic à R_s = 1,22 il doit correspondre à une impureté.

Le TMS-6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose témoin et son dérivé réduit possèdent les mêmes temps de rétention (1,75-1,56). La cochromatographie du produit étudié et du témoin 6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose donne un seul pic.

Le temps de rétention du TMS-5-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose est R_s = 1,18.

- Spectrométrie de masse-

Les dérivés peracétylés et pertriméthylsilylés du digalactoside et de son dérivé réduit ont été soumis à la spectrométrie de masse.

~ Octaacétate du digalactoside ~

Le pic de masse (M = 678) ne figure pas sur le spectre. Dans les régions de hauts poids moléculaires, nous observons un pic à m/e 619 qui correspond à M^+ - OAc (voir Fig. 10A).

Ensuite la fragmentation continue par pertes successives soit de cétène, soit d'acide acétique.

La perte de la chaîne latérale $\overset{\text{OAc}}{\overset{|}{\text{CH}_2}}\text{-}\overset{\text{OAc}}{\overset{|}{\dot{\text{C}}\text{H}}}$ (m/e 145) donnant lieu à un pic intense à m/e 533 indique la présence du galactose

---

*Les spectres de masse ont été enregistrés dans le Service de l'I.C.S.N. (Dr. B. Das).

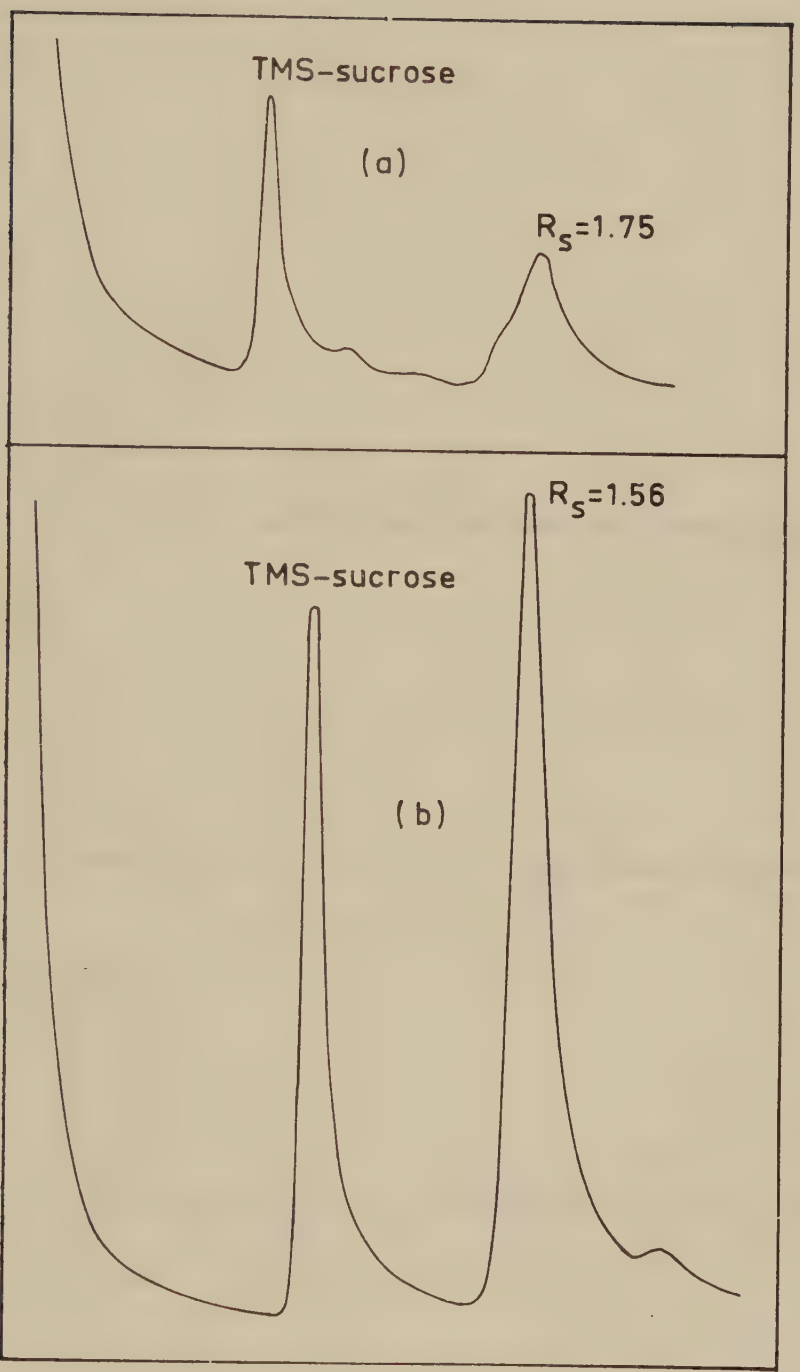
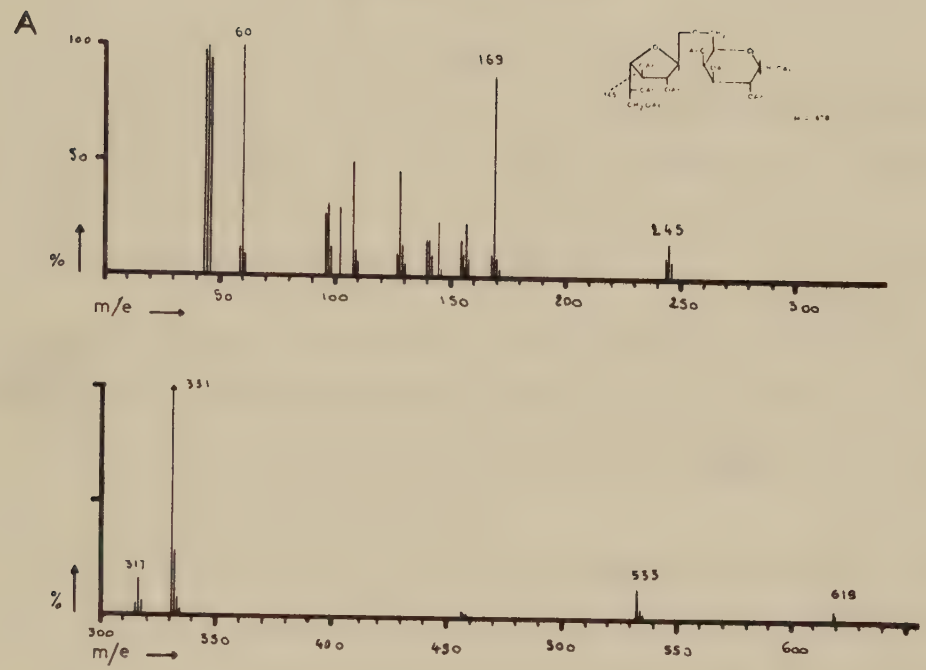


Fig. 9: Chromatographie en phase gazeuse du digalactoside

a: digalactoside triméthylsilylé

b: digalactoside triméthylsilylé puis réduit.



Spectre de masse du digalactoside peracétylé

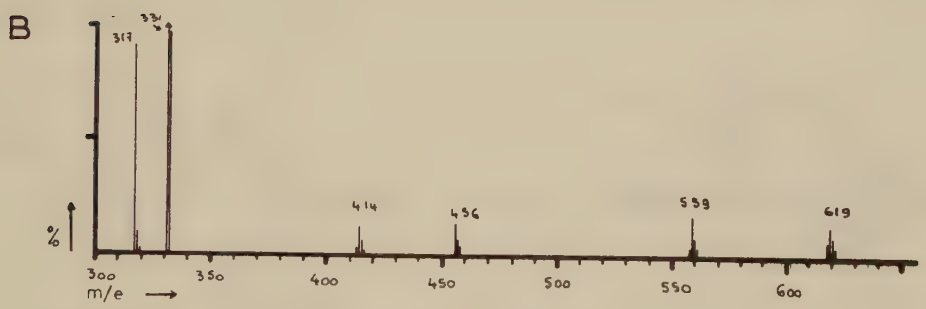
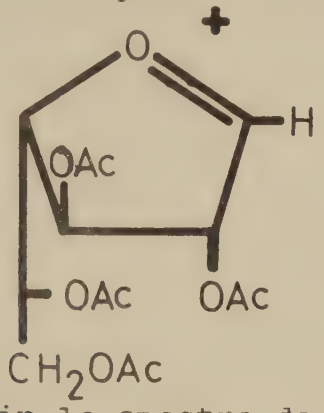


Fig. 10 Spectre de masse du lactose peracétylé

non réducteur sous forme furannosique.

Le pic de base correspond à l'ion oxonium m/e 331



m/e 331

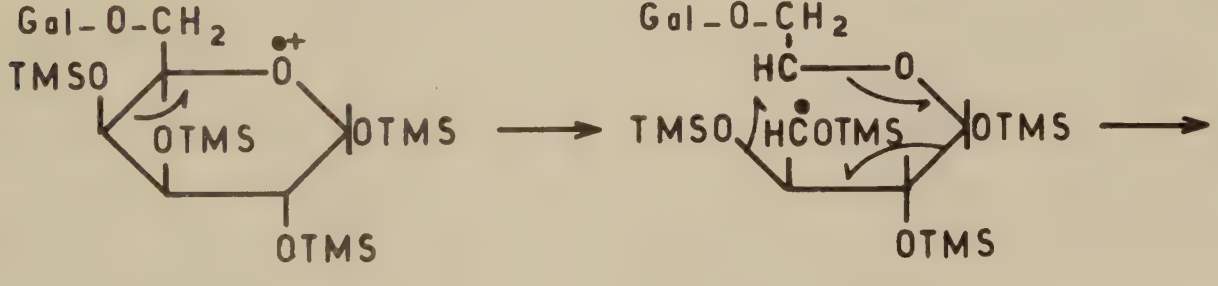
A titre de témoin le spectre de masse de l'octaacétate du lactose a été mesuré dans les mêmes conditions (voir Fig. 10B), il ne contient pas de pic à m/e 533.

- TMS galactosyl-galactose* -

Les spectres du TMS-galactosyl-galactose et du TMS-galactobiitol sont représentés sur les Fig. 11 a et b.

Le schéma de fragmentation du TMS-galactosyl-galactose est rapporté dans le tableau X.

Nous observons le pic moléculaire à m/e 918. Le pic intense à m/e 583 est caractéristique de liaisons glycosidiques en 1-6 ou en 1-5. La formation de ce pic peut être expliquée par le mécanisme suivant:



$Gal\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}CH{=}\overset{+}{O}TMS$. (Kochetkov et Coll) (83)

---

* Les spectres de masse des dérivés triméthylsilylés ainsi que ceux de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés respectivement à l'Université d'Utrecht et à Unilever Research Laboratories à Vlaardingen. Nous remercions le Dr. J-F. Vliegenthart pour sa collaboration.

Abréviation: TMS = triméthylsilyl.

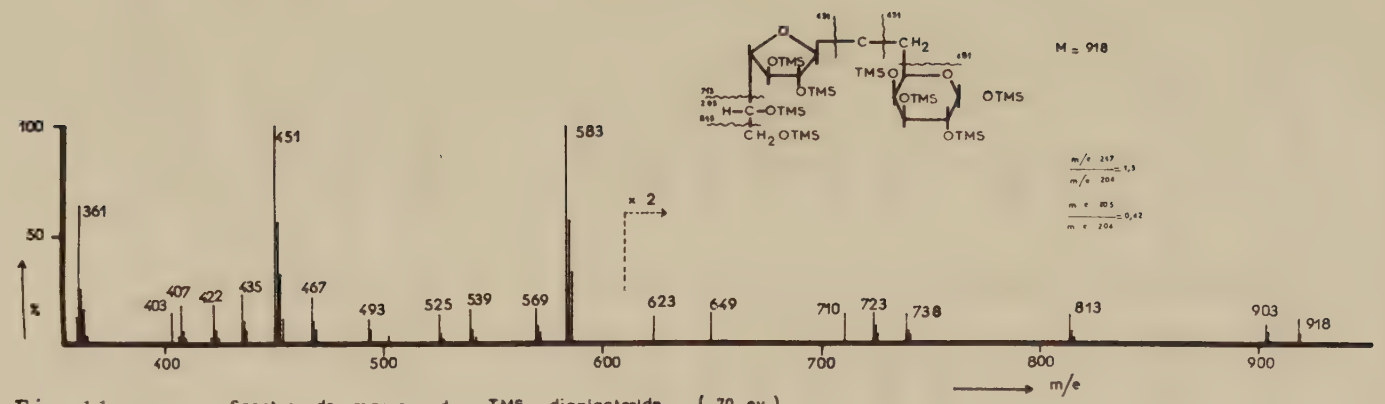


Fig. 11 a Spectre de masse du TMS - digalactoside (70 ev)

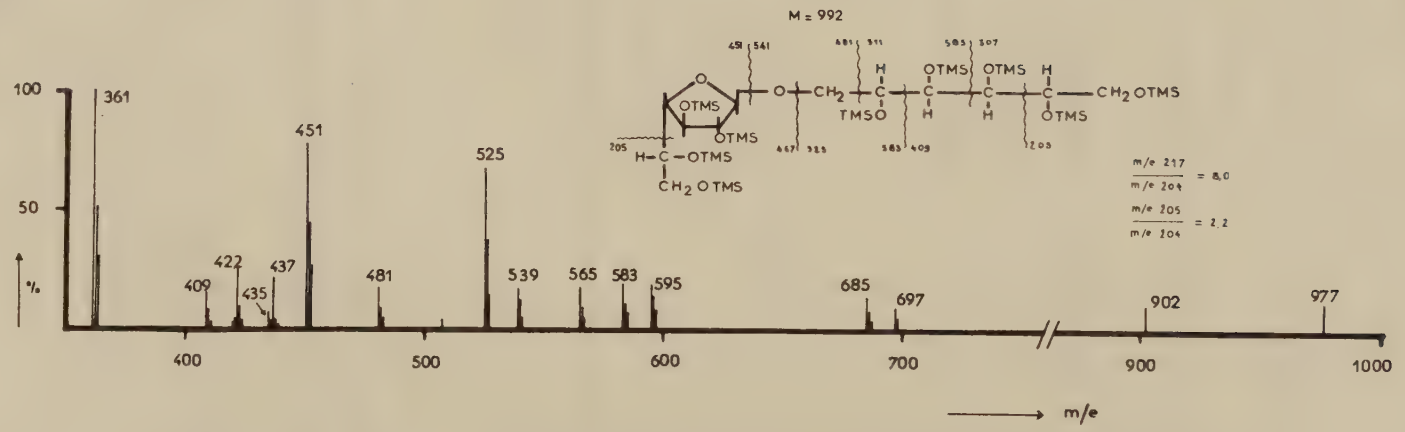


Fig. 11 b Spectre de masse du TMS digalactoside - alditol

Le pic m/e 623 indique la présence d'unité non réductrice sous forme furannosique. Les rapports des intensités relatives des pics à 217/204 (1,5), 205/204 (0,42), confirment la présence d'au moins un cycle furannosique.

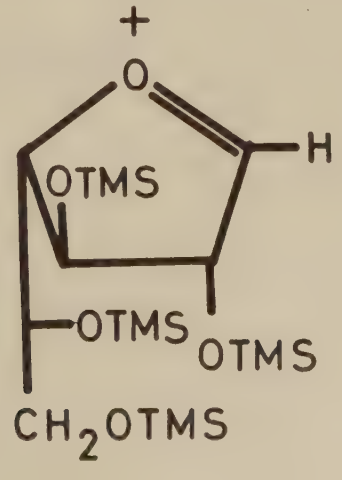
m/e	Ions.
918	M^+
623	$M^+ - TMSOH - CH_2OTMS - CHOTMS.$
583	$Gal-OCH_2-CH=\overset{+}{O}TMS$ (1-6)
	$Gal-O^+=CH-CH_2OTMS$ (1-5)
451	Gal^+
361	$451^+ - TMSOH$
217	$TMSO-CH=CH-\overset{+}{C}H-OTMS.$
205	$TMSO-CH_2-\overset{+}{C}H-OTMS.$
204	$TMSO-\overset{+}{C}H-\overset{+}{C}H-OTMS.$

Tableau X

~ TMS galactosyl-galactitol ~

Le spectre de masse du dérivé TMS réduit (M = 992) (voir Fig.11b) ne montre pas de pic moléculaire, mais nous observons le pic à m/e 977 ($M^+ - CH_3$).

Le pic à m/e 525 correspond à l'unité réduite du galactose réducteur, le pic à m/e 451 est dû à l'ion oxonium.



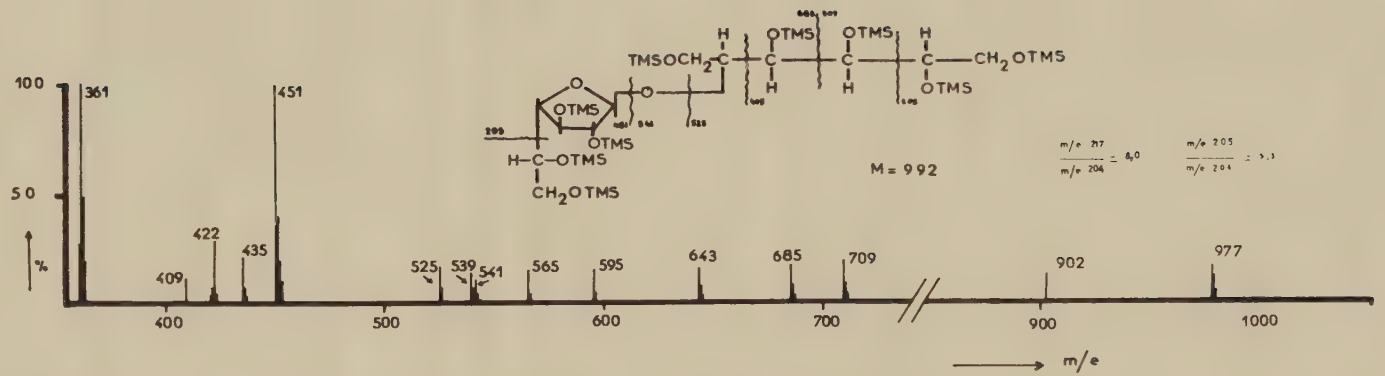


Fig. 12 Spectre de masse du TMS 5-O-β-D galactofurannosyl D galactitol (70 ev)

Le pic m/e 205 correspond à la chaîne latérale $TMSO-CH_2-\overset{+}{C}H-OTMS$ provenant à la fois de l'unité non réductrice furannosique et de l'unité réductrice.

Le rapport des intensités relatives des pics 217/204, 205/204, pour différents dérivés figure dans le tableau XI.

Tableau XI

Composés	Rapports 217/204	205/204
TMS-digalactoside-alditol	8,0	2,2
TMS-6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactitol	≃ 8,0	≃ 2,2
TMS-5-O-β-D-galactofurannosyl-galactitol	8	5,3
TMS-aldohexopyrannosyl-aldohexitols (84)	< 1	< 1

L'examen de ce tableau permet de confirmer la présence d'une unité furannosique, non réductrice (82). Notons que la spectrométrie de masse ne nous autorise pas à trancher quant à la liaison glycosidique en 1-5 ou 1-6. Elle exclue toutefois les autres possibilités.

- Spectrographie de résonance magnétique nucléaire -

L'examen des spectres de RMN du digalactoside et de son alditol triméthylsilylé permet d'attribuer la configuration β à la liaison glycosidique, et est en faveur de sa position en 1-6; il confirme également la forme furannosique du galactose non réducteur.

La triméthylsilylation transforme les hydroxyles en dérivés $OSi(CH_3)_3$, ainsi les signaux qui correspondent aux hydroxyles se trouvent éliminés. Les protons des groupements triméthylsilylés résonnent dans les champs magnétiques forts ($\delta = 0$), tandis que dans les champs faibles apparaissent uniquement les protons de C_1 à C_6.

Les protons anomériques donnent des signaux parfaitement identifiables, étant portés par le carbone lié à deux atomes d'oxygène. Par ailleurs, la réduction du disaccharide élimine le proton anomérique du sucre réducteur, ce qui facilite l'interprétation du spectre.

1) Le spectre du TMS-digalactoside en solution dans l'acétone deutériée montre dans la région anomérique 3 doublets avec de faibles constantes de couplage:

δ = 5,02 ppm ($J_{1,2} \simeq$ 2,0 Hz)

δ = 4,80 ppm ($J_{1,2} \simeq$ 2,9 Hz)

et δ = 4,77 ppm ($J_{1,2} \simeq$ 2,9 Hz)

et un doublet avec une grande constante:

δ = 4,53 ppm ($J_{1,2} \simeq$ 6,8 Hz).

Comme il a été démontré précédemment (85) pour les glucopyrannoses liés en 1-6, ce type de liaison n'influence pratiquement pas le déplacement chimique des protons anomériques du sucre réducteur, il est du même ordre que celui du TMS-α- et β-glucopyrannoses. Or, pour le TMS-α-galactopyrannose, le déplacement chimique δ est de 5,02 ppm avec la constante de couplage ($J_{1,2}$ = 2,2 Hz) et pour le TMS-β-galactopyrannose δ = 4,52 ppm ($J_{1,2}$ = 6,9 Hz).

Ces valeurs correspondent aux deux doublets décelés dans le spectre du digalactoside à 5,02 ppm pour H^{α} et 4,53 ppm pour H^{β} et indiquent la présence du cycle pyrannosique réducteur. Ce qui exclue la liaison 1-5 entre deux galactoses. Rappelons que la spectrométrie de masse ne permettait pas de conclure entre les deux positions 1-5 ou 1-6.

Lémieux et coll. (86) signalent que la constante de couplage $J_{1,2}$ peut varier entre 3,5 et 8 Hz dans le cas des α-furannosides, et de 0 à 8 Hz pour les β-furannosides. Différents auteurs (87) (88) trouvent que la constante de couplage $J_{1,2}$ du TMS-β-galactofurannose (couplage trans) est de 2,9 Hz et de 4,5 Hz pour un TMS-α-galactofurannose.

A la lumière de ces résultats, la présence de deux doublets dans le spectre du TMS-digalactoside avec la constante de couplage de 2,9 Hz, est en faveur de la liaison glycosidique β et confirme la forme furannosique du sucre non réducteur.

2) Le spectre du même dérivé a été également enregistré dans le benzène deutérié (voir Fig. 13) et il permet les mêmes conclusions. Les déplacements chimiques et les constantes de couplage figurent dans le tableau XII.

Tableau XII

Valeurs de δ et de $J_{1,2}$ de l'hydrogène anomérique

TMS-digalactoside	H^{β}_{G}	H^{α}	H^{β}
δ	5,04 ppm	5,20 ppm	4,59 ppm
$J_{1,2}$	$\simeq$ 2 Hz	2 Hz	7 Hz

Le spectre du digalactoside alditol (voir Fig. 14a) en solution acétonique confirme la configuration β de la liaison glycosidique:

δ = 4,78 ppm $\qquad$ $J_{1,2} < 1$ Hz

Ajoutons que les spectres du TMS-6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose et de son alditol sont identiques aux spectres des TMS-digalactoside intact et réduit (Fig. 13, 14 b). Quant au spectre du TMS-5-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactitol, il diffère nettement du précédent (Fig. 15).

D'après tous ces résultats, le digalactoside isolé à partir de l'arabinogalactane des parois de M. tuberculosis est un 6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose.

La forme furannosique du galactose non réducteur est démontrée aussi bien par les expériences chimiques que par la spectrométrie de masse et la spectrographie de RMN. Quant au sucre réducteur, les dérivés obtenus au cours de la perméthylation du digalactoside suggèrent la présence des cycles furannosique et pyrannosique, le spectre de résonance magnétique nucléaire est également en faveur du galactopyrannose réducteur. Or, en comparant les vitesses d'hydrolyse des galactofurannosides et galactopyrannosides (89), il est difficile d'admettre qu'une coupure

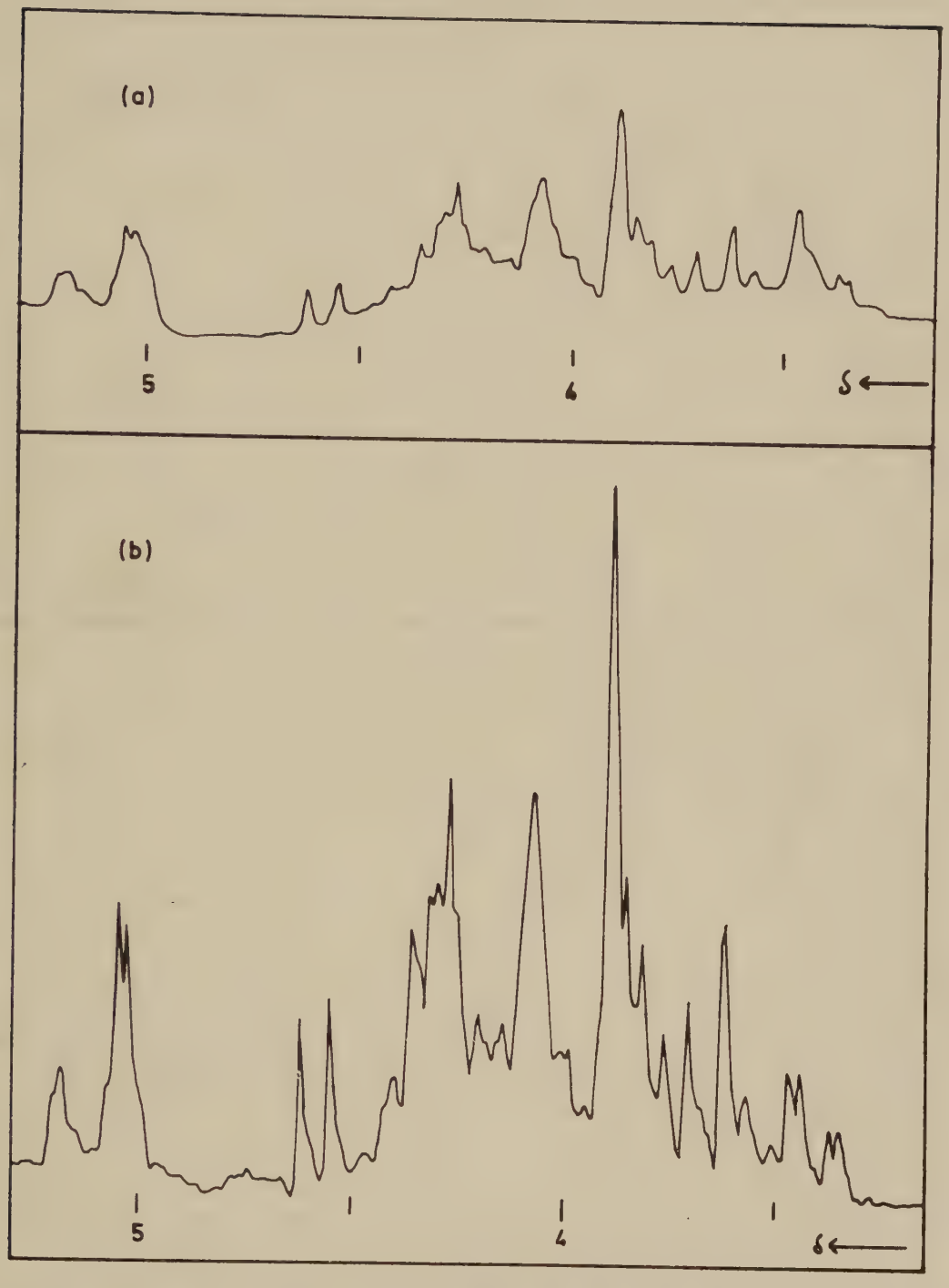


Fig. 13: a: Spectre de RMN en TF du TMS-digalactoside
b: Spectre de RMN en TF du TMS-6-O-β-galacto-furannosyl-D-galactose

a, b: 105.000, 53.750 transients

TF = transformée de Fourier

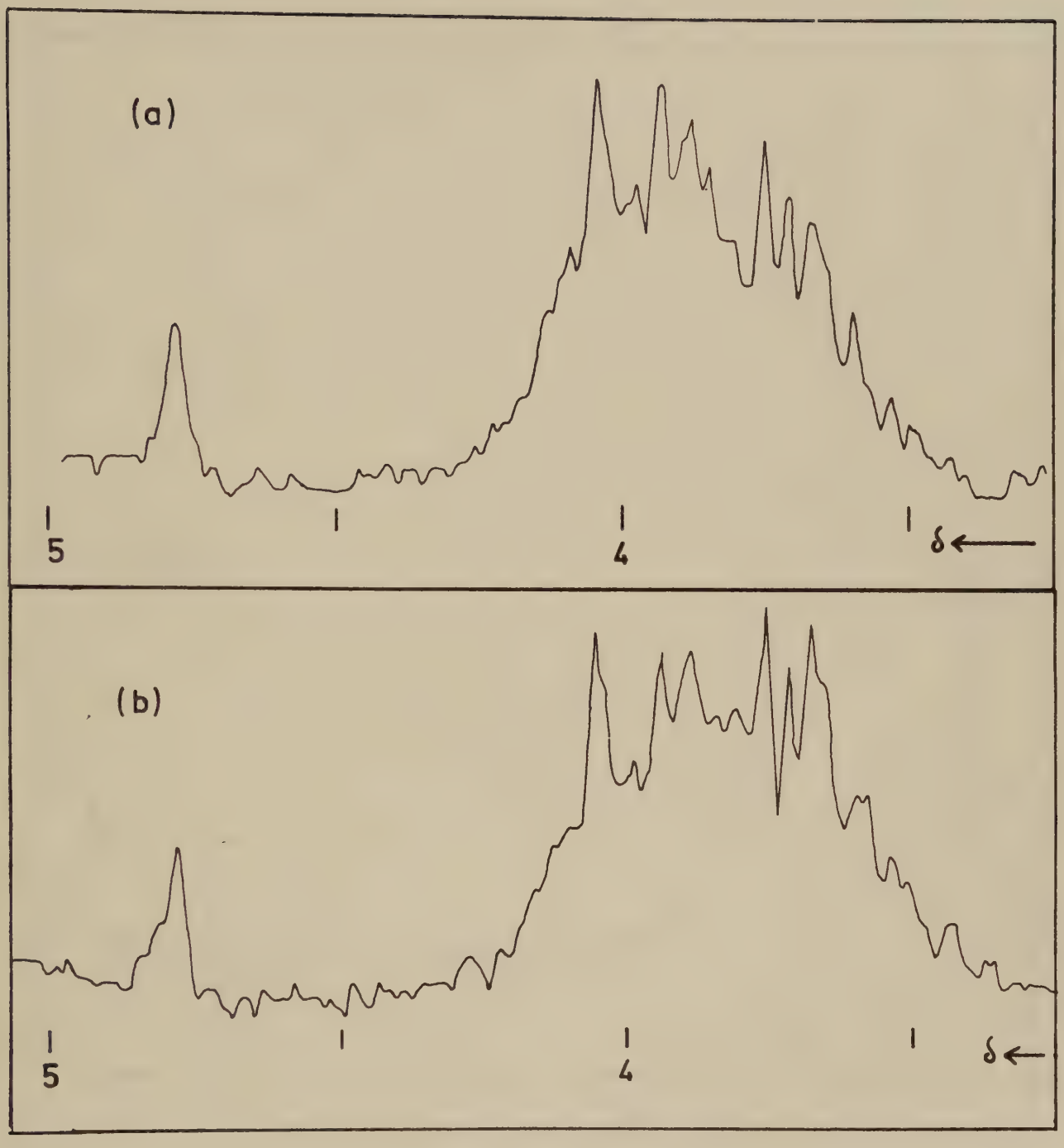


Fig. 14: a: Spectre de RMN en TF du TMS-digalactoside alditol
b: Spectre de RMN en TF du TMS-6-O-β-galctofurannosyl-D-galactitol

a, b: (1.000 transients)

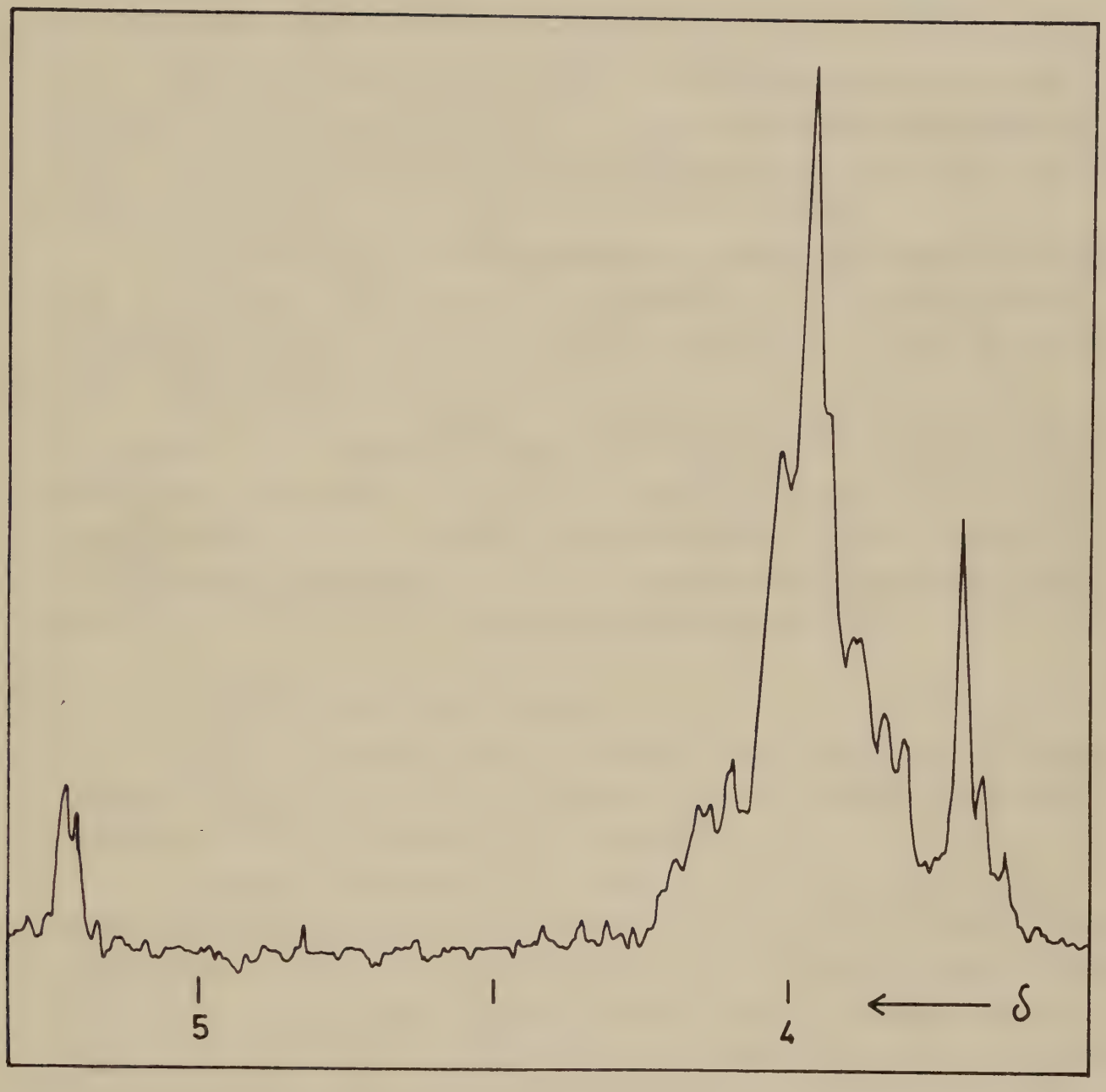


Fig. 15: Spectre de RMN en TF du TMS-5-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactitol (100 transients)

puisse avoir lieu au niveau du galactopyrannose avant que le galactofurannose soit scindé. Il est évident que les deux unités adjacentes du galactose doivent être sous forme furannosique; le changement de cycle interviendrait au cours de l'hydrolyse.

L'absence parmi les produits de méthylation de l'arabinogalactane intact du dérivé 2,3,4-tri-O-méthyl-galactopyrannose (seul le 2,3,5-tri-O-méthyl-D-galactofurannose a pu être identifié) est également en faveur de cette structure.

La présence des galactofurannoses exclut également la liaison 1-4 entre l'arabinose et le galactose. Il est évident que la structure de l'arabinogalactane proposée par Misaki et coll. doit être modifiée (47, 70, 71).

Ajoutons que le D-galactofurannose est peu répandu dans la nature. Il a toutefois été isolé récemment de quelques micro-organismes, notamment: des polysaccharides spécifiques de Pneumococcus (90a), de la fraction antigénique du lipopolysaccharide de Salmonella friedenau (90b), de galactane de Mycoplasma mycoïdes (73) et de celui de Penicillium charlesii (91).

B. Synthèse du disaccharide

En vue de synthétiser le digalactoside nous avons préparé quelques dérivés du galactofurannose sous la direction du Professeur P. Sinay (Orléans) (voir schéma 2).

Le β-galactofurannoside d'éthyle (I) a été préparé selon la méthode de Green et Pacsu (92), par l'action des sels de mercure (HgO, $HgCl_2$) sur le dithioacétal du galactose, dans l'éthanol absolu. La cristallisation répétée dans l'éthanol, puis dans l'acétate d'éthyle permettent d'obtenir le produit cristallisé (aiguilles incolores) F = 85-86° avec un rendement de 70%.

La benzylation du composé I selon Iwashige (93) par le chlorure de benzyle en présence d'hydrure de sodium dans le diméthylesulfoxide conduit au 2,3,5,6-tétra-O-benzyl-galactofurannoside d'éthyle (II). Ce dérivé après purification sur colonne et distillation sous vide reste huileux. Son analyse centésimale et son spectre de RMN sont en accord avec la structure proposée.

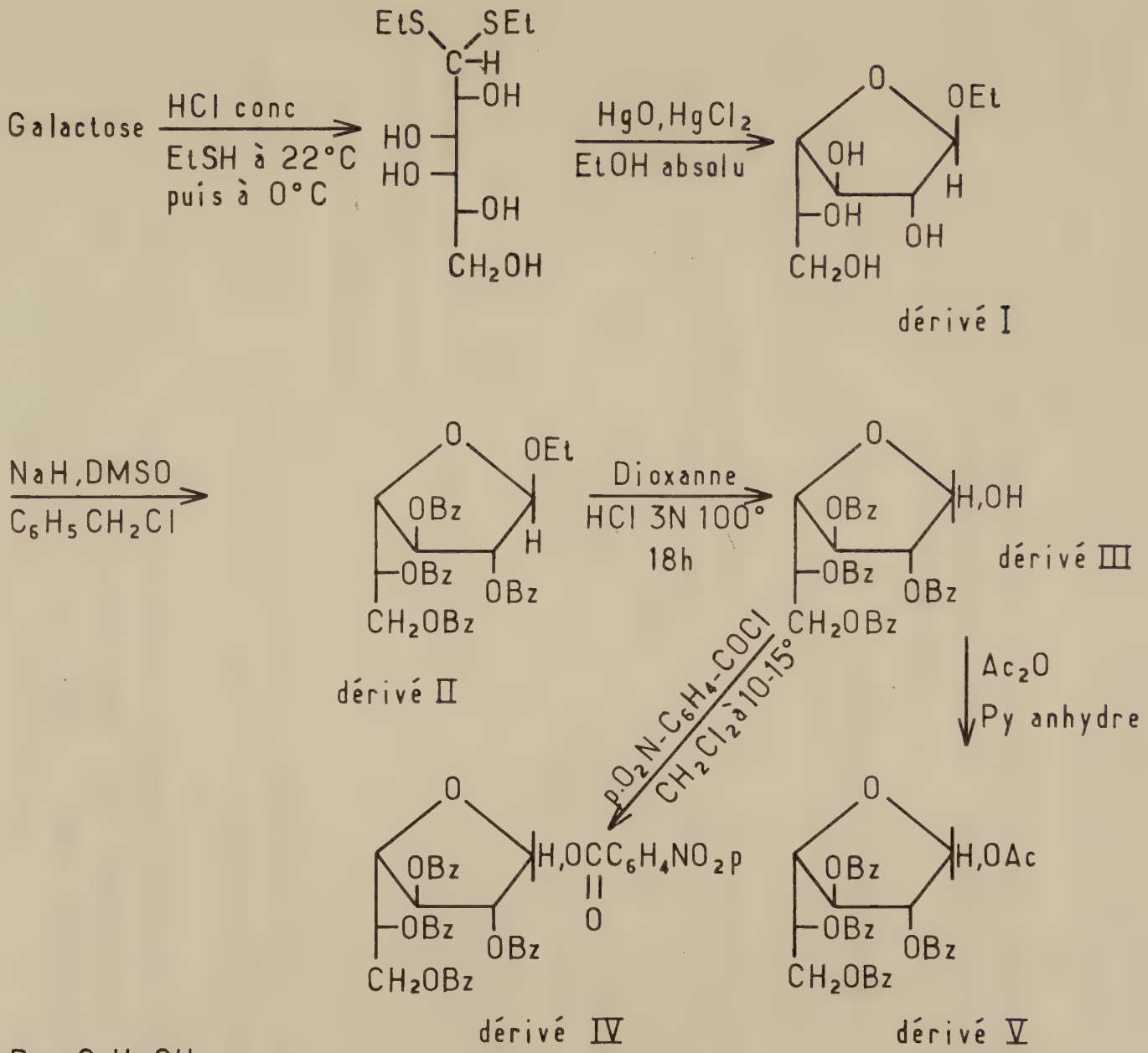

Galactose
HCl conc
EtSH à 22°C
puis à 0°C
HgO, HgCl2
EtOH absolu
dérivé I
NaH, DMSO
C6H5CH2Cl
Dioxanne
HCl 3N 100°
18h
dérivé II
dérivé III
p.O2N-C6H4-COCl
CH2Cl2 à 10-15°
Ac2O
Py anhydre
dérivé IV
dérivé V
Bz = C6H5CH2 –

Schéma 2

Il est hydrolysé dans le dioxanne par l'acide chlorhydrique 3N pour donner le 2,3,5,6-tétra-O-benzyl-galactofurannose (III).

L'acétylation par l'anhydride acétique dans la pyridine anhydre du composé III fournit le 1-O-acétyl-2,3,5,6-tétra-O-benzyl-D-galactofurannose (V).

Le traitement du dérivé III par le chlorure de paranitrobenzoyle dans le dichlorométhane conduit au 1-paranitrobenzoyl-2,3,5,6-tétra-O-benzyl-D-galactofurannose IV.

D'autre part, le dérivé I est perméthylé selon Hakomori, puis hydrolysé et méthanolysé pour donner le 2,3,5,6-tétra-O-méthyl-D-galactofurannoside.

Ce dérivé I est tritylé par le chlorure de triphénylméthane en présence de pyridine, pendant 48 heures (94). Le dérivé tritylé en position 6 est obtenu dans ces conditions. La détritylation par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique glacial et l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 3N dans le dioxanne conduisent au 2,3,5-tri-O-méthyl-galactofurannose. Ce produit a été méthanolysé pour donner le 2,3,5-tri-O-méthyl-galactofurannoside de méthyle utilisé comme témoin pour la chromatographie en phase gazeuse.

C. Trisaccharide

Le trisaccharide ayant la vitesse de migration $R_{Treh.}$ = 0,82 dans le solvant B est recueilli par chromatographie préparative sur papier.

Son hydrolyse acide fournit de l'arabinose, du galactose, et du glucose identifiés par chromatographie sur papier dans le solvant B. Il pourrait s'agir d'un mélange de deux disaccharides, ou d'un disaccharide et d'un trisaccharide.

Nous avons alors essayé de les séparer par chromatographie en couche mince, sous leur forme acétylée.

Pour ce faire, la substance de $R_{Treh.}$ = 0,82 est acétylée en présence de pyridine anhydre dans l'anhydride acétique, puis chromatographiée dans le solvant S sur couche mince de Silicagel

G, en présence de témoins: arabinose, tréhalose et raffinose peracétylés (voir Fig. 16).

La révélation spécifique des esters par l'hydroxamate (95) permet de déceler deux taches de R_f = 0,76 et R_f = 0,58 au niveau du tréhalose et du raffinose peracétylés témoins (Fig. 16, p. 52).

Les deux produits sont isolés par chromatographie préparative en couche mince dans le même système de solvants. La fraction a (R_f = 0,76) est examinée par la spectrométrie de masse, la fraction b (R_f = 0,58) est hydrolysée puis chromatographiée sur papier dans le solvant C.

Le spectre de masse de la fraction a montre qu'il s'agit d'un mélange; en effet, des pics à m/e 259 et m/e 331 sont présents. Ils correspondent aux ions oxonium provenant soit de l'arabinose, soit du glucose ou du galactose.

La chromatographie sur papier indique après révélation spécifique la présence d'arabinose, de galactose (en grande quantité)et de glucose .

La faible quantité de produit disponible nous a fait abandonner les essais de purification de ces oligosaccharides.

Examen des glycolipides

Comme nous l'avons déjà rapporté, le résidu insoluble obtenu par hydrolyse trichloroacétique, fournit une fraction soluble dans le chloroforme.

Cette substance est méthylée par le diazométhane afin de transformer les acides libres présents en esters, et chromatographiée sur colonne d'acide silicique:célite (2:1).

- Mycolate de méthyle -

Les premières fractions éluées avec du chloroforme pur sont constituées par le mycolate de méthyle, identifié par chromatographie en couche mince, en présence de témoins authentiques.

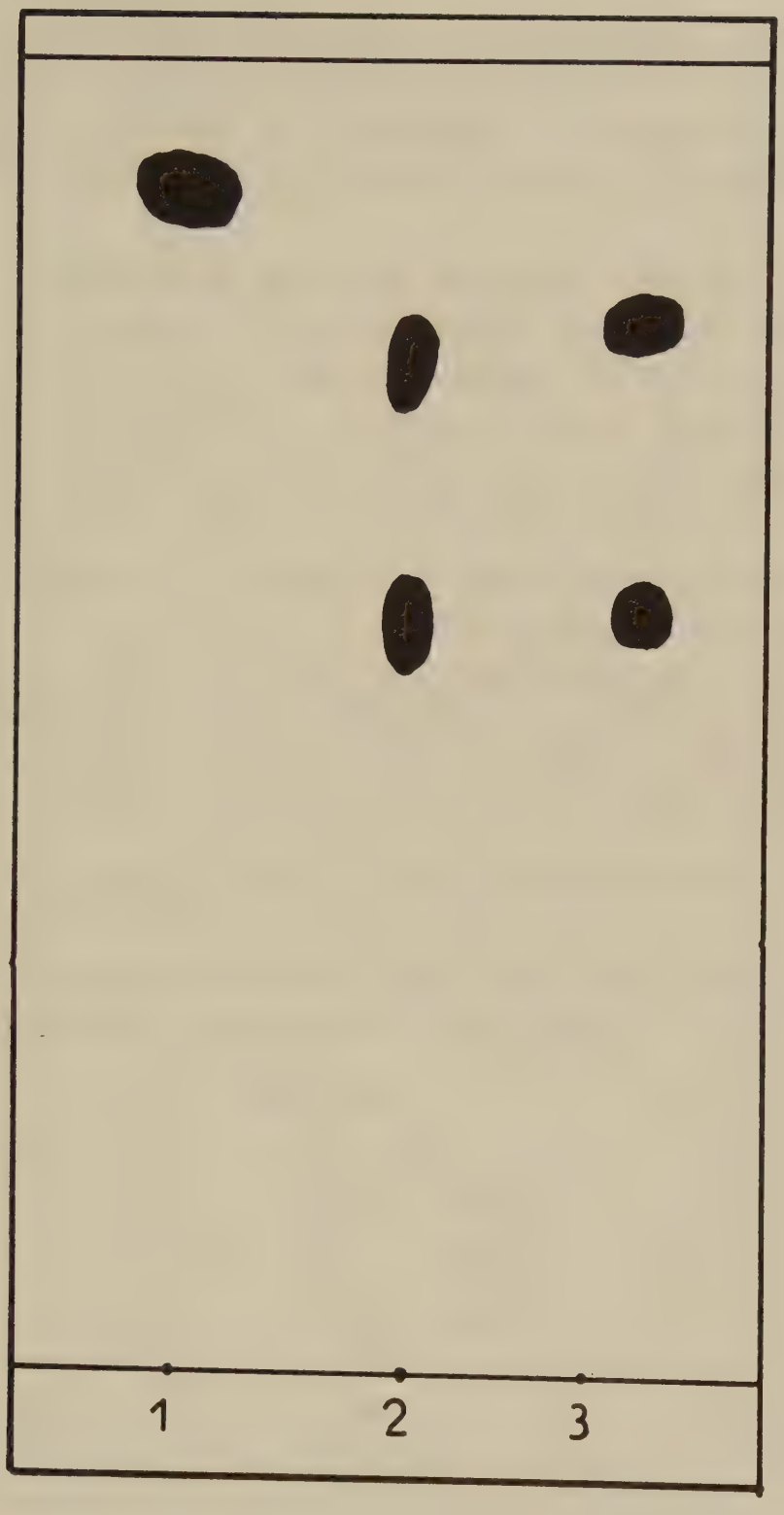


Fig. 16: Chromatographie sur couche mince du trisaccharide acétylé.

1, 3 : arabinose, raffinose et tréhalose peracétylés
2 : trisaccharide acétylé.

- Glycolipide I -

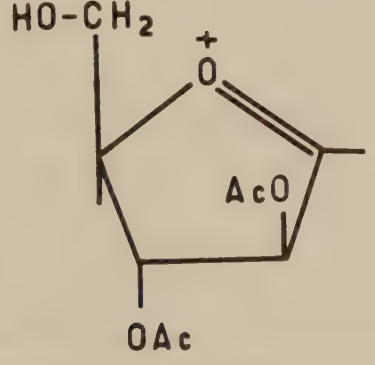
La substance éluée par le chloroforme à 2% de méthanol est constituée par un glycolipide F = 44-45°C, contenant 10% de sucres (calculés en arabinose). Son spectre IR, en particulier la bande ester à 1735 cm^{-1} montre la présence d'un ester.

Les hydrolyses acide et alcaline libèrent uniquement de l'acide mycolique et de l'arabinose identifiés par chromatographies en couche mince dans le solvant R (R_f = 0,27) et sur papier dans le solvant A. Il s'agit donc d'un mycolate d'arabinose, isolé précédemment à partir des lipides liés, par Azuma (96a) et Acharya (97), et à partir des Cires D (61).

Le spectre de masse du mycolate d'arabinose peracétylé a été enregistré (98). Le pic moléculaire est absent. Les pics à m/e 1100, 1128, 1156 correspondent aux ions formés à partir d'acide mycolique (comportant un méthoxyle et un cyclopropane) par élimination d'une molécule d'acide acétique et du méthanol, avec scission de la liaison C-O et perte d'un H.

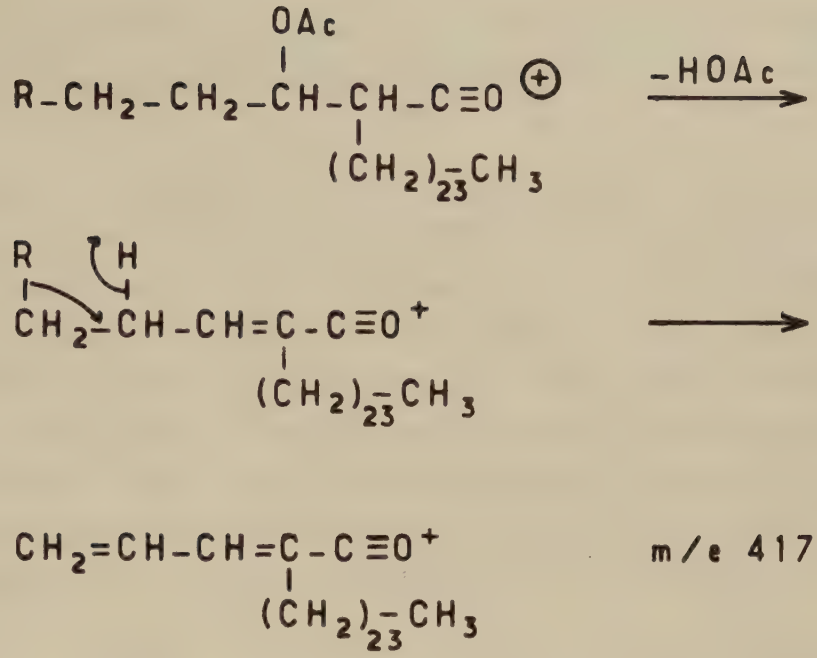
Nous trouvons dans la partie inférieure du spectre, les pics significatifs à m/e 217, 325 et 417.

La structure suivante peut être proposée pour l'ion m/e 217 ainsi formé (ion oxononium réarrangé).



Le pic à m/e 325 ($C_{22}H_{45}O$) correspond à un fragment contenant le méthoxyle. Cet ion se trouve aussi dans le spectre des mycolates de méthyle.

L'ion m/e 417 ($C_{29}H_{53}O$) peut s'expliquer comme suit:



Notons que les mêmes ions provenant de la fragmentation du radical acyle ont été observés dans le spectre de masse du "Cord Factor" et des Cires D isolées de la souche Peurois de M.tuberculosis (99).

- Glycolipide II -

Ce produit est élué avec du chloroforme à 5% de méthanol. Il contient 18% de sucres, et fournit également après hydrolyse acide, de l'arabinose et un mélange d'acides mycoliques. Son hydrolyse alcaline permet d'obtenir une substance hydrosoluble ayant un $R_{Treh.}$ = 0,96 dans le solvant C. Cette substance est isolée par chromatographie préparative sur papier dans le même solvant, son hydrolyse acide donne uniquement de l'arabinose.

Le dosage des sucres permet de vérifier que la substance éluée du papier est composée seulement de sucres réducteurs. La réduction par le borohydrure de sodium est effectuée sur ce produit et suivie d'un nouveau dosage qui permet d'observer une diminution de 47% de l'intensité d'absorption.

Le glycolipide II est donc un mycolate d'arabinobiose. Dans notre laboratoire, le même dérivé a été isolé à partir des Cires D de la souche Peurois de M.tuberculosis, la liaison 1-3 entre les deux molécules d'arabinose a été rapportée (98).

La faible quantité du mycolate d'arabinoniose obtenue ne nous a pas permis de caractériser la liaison entre les deux oses.

Un mycolate de diarabinose a été également isolé à partir des lipides liés d'une souche de M.tuberculosis par Azuma (96a) sans que la liaison entre les deux sucres ait été précisée. Or, l'examen détaillé de la structure des Cires D ainsi que l'étude critique du mode d'obtention des lipides liés nous permettent de conclure que ces deux produits sont formés par dégradation des parois. Ainsi, les Cires D se forment par autolyse de ces dernières, tandis que les lipides liés sont obtenus par leur hydrolyse ménagée au niveau de l'arabinofurannose (voir paragraphe suivant).

D'après les résultats cités ci-dessus, nous pouvons donc conclure que les acides mycoliques estérifiant l'arabinose terminal non réducteur de l'arabinogalactane forment la partie lipopolysaccharidique des parois.

Quant à l'arabinogalactane il possède une structure ramifiée comportant environ 5 molécules d'arabinose pour 2 molécules de galactose, son squelette est constitué par les arabinofurannoses liés en 1-5 et les galactofurannoses liés en 1-6; les mycolates d'arabinose ou d'arabinobiose forment les chaînes latérales.

- Lipides liés -

Il a été démontré depuis longtemps qu'il est impossible d'extraire tous les lipides des bactéries acido-résistantes par les solvants neutres tels que l'alcool, l'éther ou le chloroforme.

Ces lipides résiduels ont été désignés par Anderson et ses collaborateurs (100) par le terme de lipides liés ("firmly bound lipids"). Une quantité importante de lipides peut être extraite avec des solvants neutres, à partir des résidus bactériens traités au préalable avec de l'acide chlorhydrique très dilué ou avec les alcalis. En 1938, Fethke suggérait que ces lipides seraient liés aux protéines (101).

Anderson a rapporté la composition chimique des lipides liés isolés des bacilles tuberculeux de souches humaines, des bacilles de la lèpre, des bacilles aviaires, après chauffage avec l'acide chlorhydrique à 2% à 50°C (102, 103).

Les lipides de Mycobacterium tuberculosis variété hominis et M avium peuvent être fractionnés en passant la solution éthérée ou chloroformique à travers un filtre Chamberland. Les deux fractions contiennent comme produits de clivage essentiellement des acides mycoliques et un polysaccharide spécifique, qui par son hydrolyse donne principalement de l'arabinose, du galactose, du mannose et des traces de glucosamine et d'inositol.

Plus récemment, Azuma et Yamamura ont isolé sous des conditions plus douces (en chauffant les cellules délipidées avec de l'acide chlorhydrique 0,1N à 37° pendant 22 heures) de M.tuberculosis, souche Aoyama B, une fraction de lipides liés, identifiés à un mycolate d'arabinofurannose (96a et b).

Le même glycolipide isolé des lipides liés, de BCG et de M.Kansasii a été décrit par Acharya, Senn et Lederer (97).

Nous avons répété l'expérience avec les résidus bactériens de M.tuberculosis $H_{37}R_a$, délipidés par des extractions répétées avec l'alcool-éther, le chloroforme et le chloroforme-méthanol.

Après une hydrolyse douce (0,1N HCl à 37° pendant 22 heures), les bactéries sont extraites avec le chloroforme et l'éther. Les extraits sont évaporés jusqu'à siccité et le résidu est analysé par chromatographie en couche mince (solvants X et U), il est ensuite soumis à l'hydrolyse acide. Ses constituants sont identifiés par chromatographie sur papier et par spectrométrie de masse.

La fraction obtenue, la plus importante (80%) est le mycolate d'arabinose .

Après hydrolyse les seuls constituants de la phase éthérée sont les acides mycoliques, ceux de la phase aqueuse sont l'arabinose et des traces de galactose.

Ces données et les résultats décrits ci-dessus suggèrent que les lipides liés des bacilles tuberculeux de souche humaine

sont une partie intégrale des parois bactériennes formées par un complexe d'arabinogalactane mycoylé et d'un peptidoglycane.

L'hydrolyse ménagée est nécessaire et suffisante pour couper le mycolate d'arabinogalactane. L'obtention d'une quantité importante d'arabinose est cohérente avec la forme furannosique du pentose.

Glucane

- Isolement et étude du glucane -

Comme nous l'avons signalé plus haut, la précipitation de l'hydrolysat alcalin des parois de M.tuberculosis $H_{37}Ra$ au moyen de l'éthanol, fournit un glucane. Le même polysaccharide a pu être isolé à partir des parois traitées préalablement par l'acide thrichloroacétique et extraites au moyen de chloroforme (afin d'enlever les glycolipides). Le résidu insoluble résultant de cette dégradation est mis en suspension dans la soude aqueuse 0,1N et maintenu, en contact 2 heures, à la température ambiante sous agitation. La solution basique est neutralisée par l'acide acétique, réduite à un faible volume et précipitée par l'éthanol. Par centrifugation le précipité incolore est isolé, sa solution aqueuse est opalescente. Son hydrolyse par l'acide chlorhydrique 2N fournit du glucose (solvants A et C), accompagné de faibles quantités d'arabinose.

- Purification -

Le précipité est purifié par chromatographie sur une colonne de Sephadex G-25. Le schéma d'élution est représenté dans la Fig. 17.

La fraction A est constituée par un polysaccharide donnant après hydrolyse acide, uniquement du glucose: il s'agit du glucane.

La fraction B contient du glucose et des faibles quantités d'arabinose.

Afin de déterminer le mode de liaison des unités glycosidiques, dans le polysaccharide, nous avons soumis la fraction A à l'oxydation periodique et à la perméthylation.

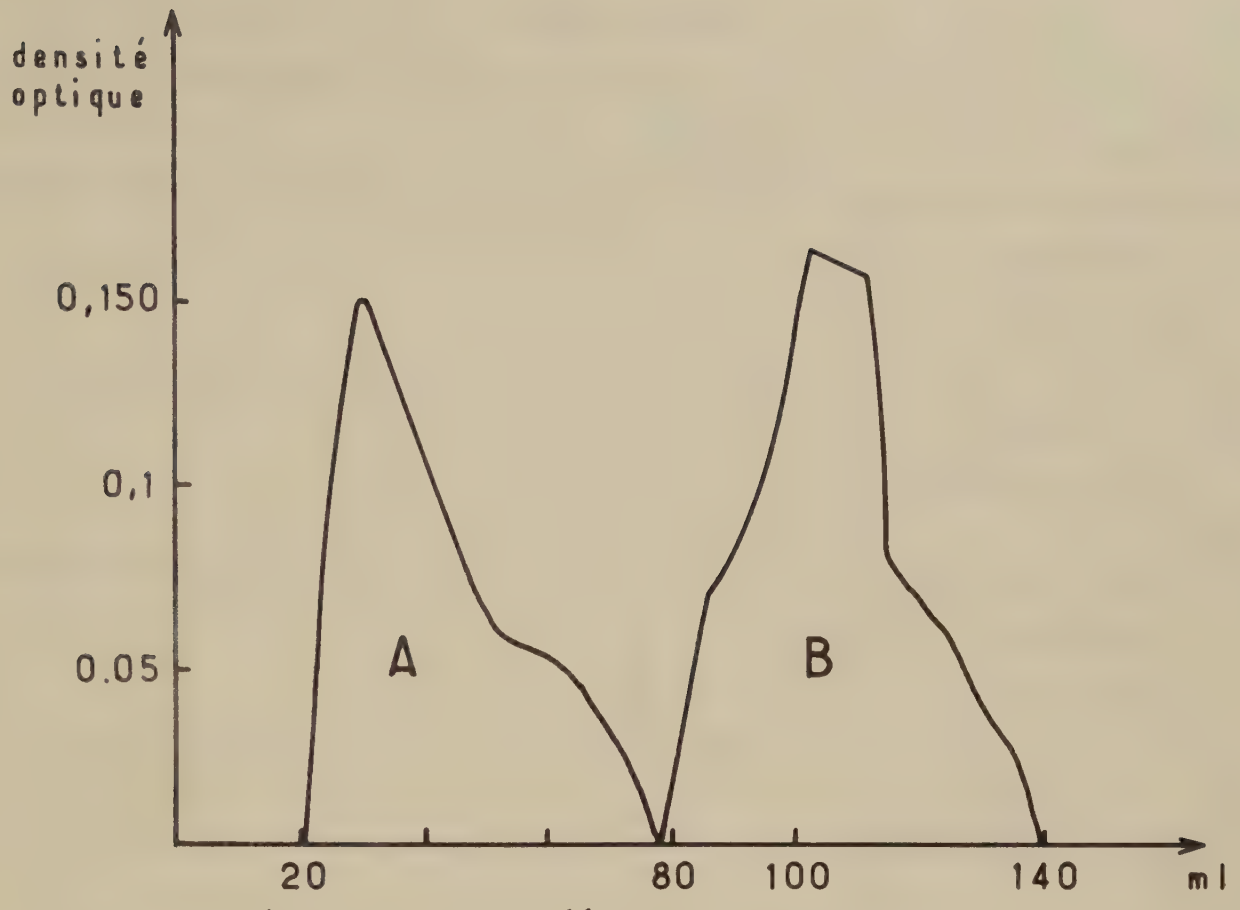


Fig 17 Courbe d'élution du glucane

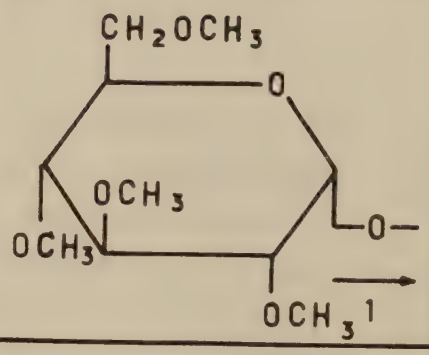
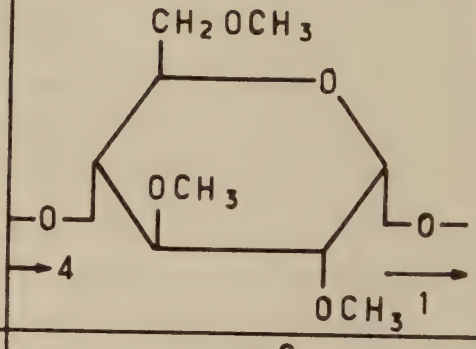
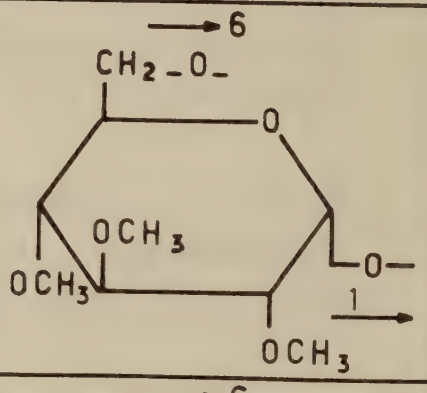
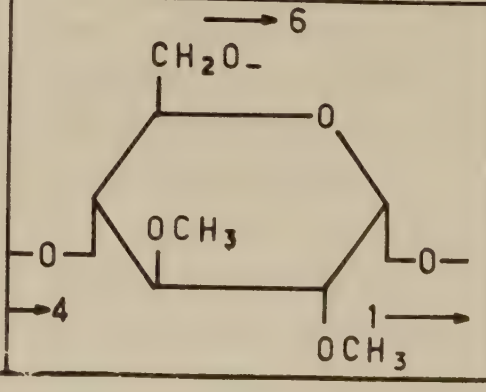
Le produit d'oxydation est hydrolysé et chromatographié sur papier dans les solvants A et C. Il ne contient pas de glucose intact. Ce résultat élimine la possibilité d'une liaison en 1-3.

Les méthylations d'abord par le sulfate de méthyle (104) ensuite selon Hakomori (67) fournissent une substance perméthylée dont le spectre IR ne présente plus de bande hydroxyle. Elle est hydrolysée et chromatographiée sur papier dans les solvants P et I en présence de témoins authentiques. Les révélations par le phtalate acide d'aniline, par le trichloroacétate de N,N'-diméthylaniline (105) et le chlorure de triphényltétrazolium (69) permettent d'identifier les dérivés qui figurent dans le tableau XIII.

L'identification d'un dérivé 2,3,6-tri-O-méthyl-D-glucose indique une liaison glycosidique en position 4.

L'obtention d'un 2,3-di-O-méthylglucose est en faveur d'une ramification en position 6. La faible quantité d'un

Tableau XIII

Dérivés méthylés	Rg dans le solvant P	Liaisons possibles
2, 3, 4, 6-tétra-O-méthyl-glucose	1	
2, 3, 6-tri-O-méthyl-glucose	0,81	
2, 3, 4-tri-O-méthyl-glucose *	0,85	
2, 3-di-O-méthyl-glucose	0,55	

Dérivés méthylés du glucose

* A l'état de traces

2,3,4-tri-O-méthyl-D-glucose identifié suggère l'existence d'une liaison en 6.

Nos résultats semblent confirmer la structure ramifiée du glucane proposée par Misaki pour le polysaccharide isolé de BCG (47), la plupart des liaisons étant en 1-4, il existe toutefois des unités liées en 1-6.

Nous avons également préparé ce glucane par hydrolyse alcaline des cellules bactériennes d'une souche de Mycobacterium tuberculosis, BCG. L'hydrolysat est après la neutralisation, dialysé et la solution précipitée au moyen d'éthanol. Le précipité obtenu en ajoutant 25% d'éthanol constitue le glucane, $[\alpha]_D$ = +125° pratiquement pur. La valeur élevée de sa rotation spécifique indique qu'il s'agit d'un α-glucane.

Son spectre IR mesuré dans le KBr présente des bandes caractéristiques: ainsi celle très importante à 3400 cm^{-1} correspond aux hydroxyles, l'absorption à 925-930 cm^{-1} indique la présence de cycles pyrannosiques, une bande à 845 cm^{-1} et l'absence d'absorption à 895 cm^{-1} confirment l'α configuration des oses. L'absence des bandes à 1250 et 1750 cm^{-1} indiquerait que le glucane n'est pas estérifié, mais étant donné son mode d'obtention (traitement alcalin des parois) ceci ne peut pas constituer une preuve suffisante.

Rappelons que nous l'isolons avec le rendement de 4 à 5% par rapport au poids sec des parois tandis que l'arabinogalactane constitue environ 20%. Le glucane n'est donc qu'un constituant mineur.

Chargaff et Moore (106) ainsi que Kent et Stacey (107) ont isolé à partir des cellules intactes de M.avium, par extraction avec l'acide trichloroacétique à froid ou par action d'alcali à 90°C, "un glycogène", mais ces auteurs ne donnent pas de précision quant à l'enchaînement des oses.

Récemment Antoine et Tepper (108) ont obtenu à partir de plusieurs souches de Mycobactéries, par extraction avec de l'eau, des préparations de glycogène. Ces auteurs ont, en outre, étudié la teneur en glycogène des microorganismes en fonction de l'âge de la culture et de la source d'azote employée.

Ajoutons que certains glucanes isolés à partir de champignons et des lichens semblent dotés de propriétés antitumorales, mais il s'agit surtout de β-glucane possédant des liaisons 1-3 (109).

L'activité adjuvante de l'α-glucane, isolé à partir des parois des bacilles Calmette-Guérin, a été testée par Mme Rita Ciorbaru (Institut de Biochimie à Orsay) sur les cobayes. Les résultats figurent dans le tableau XIV.

Tableau XIV

Activité adjuvante: µg d'anticorps anti ovalbumine par ml d'antisérum

	Moyenne	Granulome	Toxicité
Adjuvant incomplet de Freund	524	-+	-
Adjuvant complet de Freund	3668	5+	+
Glucane ($H_{37}R_a$) 100 µg/cobaye	1140	$\pm^{+}$	Très +++

Il semble faiblement actif mais très toxique.

Le glucane fait-il effectivement partie des parois? Nos résultats ne permettent pas cette affirmation. Il peut se trouver dans nos préparations à cause de son insolubilité dans les solvants utilisés pour la purification des parois.

- Digestion du mucopeptide par le lysozyme - (111)

Strominger et Ghuysen (110) signalent que l'affinité des enzymes bactériolytiques vis-à-vis des liaisons sensibles du peptidoglycane est souvent inhibée ou supprimée par la présence d'autres constituants des parois. Il est connu que le lysozyme reste sans effet sur les parois des bactéries Gram-négatives, et de nombreuses espèces Gram-positives telles que Coryne bacterium, Proprionibacterium ou Clostridium dont les parois

contiennent en plus du peptidoglycane, les polysaccharides associés avec les lipides, et les protéines. Un traitement chimique ou physique dissociant ces constituants rend l'attaque du lysozyme efficace.

Nous avons soumis à la digestion par le lysozyme, d'une part:- le mucopeptide obtenu par oxydation periodique des parois dont la composition figure dans le tableau IV.

- d'autre part, le résidu insoluble provenant de l'extraction des parois par l'acide trichloroacétique et contenant encore environ 5% des sucres.

Les deux produits en suspension dans l'eau ammoniaquée à pH = 6,5 sont traités par le lysozyme (solution à 1%) pendant 24 heures. Après inactivation de l'enzyme (chauffage à 100° pendant 10') les surnageants sont séparés des résidus par centrifugation et le traitement enzymatique est répété une seconde fois. Les produits solubilisés pendant les deux opérations sont réunis, leurs solutions sont lyophylisées et leurs contenus analysés par chromatographie sur papier et sur échangeurs d'ions.

Une analyse parallèle est effectuée également sur les deux résidus. Le mucopeptide obtenu par oxydation periodique est entièrement solubilisé par le lysozyme. La totalité de l'acide muramique, de la glucosamine, et de l'acide diaminopimélique se retrouvent dans le surnageant. Le résidu insoluble contient uniquement les acides aminés protéiniques. Quant à la préparation ayant subi l'extraction trichloroacétique, environ 50% de son mucopeptide sont dégradés par l'enzyme.

Donc, la présence de sucres neutres résiduels rend la solubilisation du mucopeptide plus difficile.

Récemment, Adam et coll.(112) ont signalé l'obtention d'un produit hydrosoluble possédant une forte activité adjuvante par action du lysozyme sur les parois intactes de M.Smegmatis. Dans ce cas, environ 10% du mucopeptide sont solubilisés par le traitement enzymatique.

VI. Acétolyse des parois (55)

Toujours dans le but d'obtenir des fragments plus ou moins dégradés des parois, nous avons effectué l'acétolyse de ces dernières. Le traitement des parois par un mélange d'acides acétique et sulfurique, et d'anhydride acétique (10 vol: 1 vol:10 vol.) suivi d'extraction au moyen du chloroforme, fournit un mélange d'oses et d'oligosaccharides peracétylés ainsi qu'une lipoprotéine.

Les essais de séparation de ces différents acétates par chromatographie en couche mince de Silicagel et sur colonne de trisilicate de magnésium:célite, ou encore gel de silice Davison n'ont pas donné les résultats attendus. En effet, les disaccharides (R_f = 0,44 dans le solvant S) ont pu être séparés des trisaccharides (R_f = 0,34, dans le solvant S). Mais, les produits obtenus soumis à l'hydrolyse suivie de chromatographie sur papier, ou à la spectrométrie de masse, n'étaient pas homogènes. Ils contiennent, tous, l'arabinose, le galactose et le glucose. Ainsi, les oligosaccharides provenant de deux polysaccharides présents ne peuvent pas être séparés par cette méthode.

Nous avons donc procédé à la désacétylation des oses.

La phase chloroformique contenant le mélange d'acétates est soumise à une hydrolyse alcaline et le mélange réactionnel est ensuite extrait par le chloroforme. La phase hydrosoluble contient tous les sucres réducteurs et les oligosaccharides. La substance soluble dans la phase organique constitue selon les préparations entre 20 et 25% par rapport au poids initial des parois traitées.

Un échantillon est alors méthylé par le diazométhane et examiné par chromatographie en couche mince dans le solvant R Il s'avère non homogène: 4 produits sont décelés, trois correspondent aux esters méthyliques d'acides mycoliques (R_f = 0,32 0,27, 0,24), le quatrième R_f = 0 reste à identifier.

Lipoprotéine

Le produit inconnu est séparé du mélange d'acides mycoliques par chromatographie préparative sur couche mince dans le

solvant X. Dans les solvants R, S et U le produit ne migre pas. Il constitue environ 15% par rapport à la fraction lipidique (chloroformosoluble). Son hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6N (à 105°, 18 heures) fournit deux fractions éthéro et hydrosoluble en quantité à peu près égales.

La composition de la fraction hydrosoluble déterminée à l'aide de l'autoanalyseur Beckman figure dans le tableau XV.

Tableau XV

Constituants	µ moles par mg	Rapport molaire approximatif	%
Acide aspartique	0,068	1,7	9,55
Threonine	0,029	0,7	3,93
Serine	0,028	0,7	3,93
Ac. glutamique	0,082	2,05	11,51
Glycine	0,073	1,8	10,11
Alanine	0,078	1,95	10,95
Proline	0,062	1,55	8,70
Isoleucine	0,032	0,8	4,49
Leucine	0,093	2,3	12,92
Tyrosine	0,022	0,55	3,08
Phénylalanine	0,041	1	5,61
Arginine	0,030	0,75	4,21
Lysine	0,039	1	5,61
Ornithine	0,030	0,75	4,21

La phase éthérosoluble méthylée par le diazométhane est fractionnée par chromatographie sur trisilicate de magnésium. Elle contient un mélange d'esters dont le plus important quantitativement semble, d'après l'analyse centésimale, le comportement en couche mince (R_f = 0,4 dans le solvant R) et la spectrométrie de masse, correspondre à la formule brute $C_{19}H_{38}O_4$. Il est accompagné par le mélange d'esters palmitique et stéarique élués dans les premières fractions de la chromatographie.

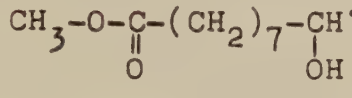
Spectrométrie de masse de l'ester gras

Le pic moléculaire m/e 330 n'est pas visible, mais dans la partie supérieure du spectre, nous trouvons une série de pics à m/e 298, 295, 281, 263 qui correspondent à:

298: M-32 par perte de méthanol
294: M-(2.18) par perte de deux molécules d'eau
281: M-(18 + 31) par perte d'une molécule d'eau et d'un méthoxyle
263: M-(2.18 + 31) par perte de deux molécules d'eau et d'un méthoxyle.

Dans la partie inférieure du spectre, nous trouvons les pics significatifs à 187 et 155.

Le pic m/e 187 correspond à l'ion:



Celui par la perte de méthanol donne le pic à m/e 155.

Cette fragmentation est en accord avec celle du spectre de masse du 9,10-dihydroxyoctadécanoate de méthyle proposée par Rhyage et Stenhagen (113).

L'obtention des acides gras et des acides aminés libres au cours d'une hydrolyse acide énergique suggère l'existence d'une liaison peptidique entre le carboxyle de l'acide gras, et un groupement aminé d'un acide aminé appartenant à une protéine ou à un polypeptide.

L'existence d'une lipoprotéine ou d'un lipopeptide pourrait être envisagée. Toutefois, nos résultats ne nous permettent pas de conclure si il s'agit d'une substance homogène ou d'un mélange de chaînes peptidiques amidées par les acides gras. Remarquons que la fortuitine*, un lipopeptide contenant 9 acides aminés (P.M. = 1.350) possède dans le solvant X un R_f = 0,70 [R_f du produit étudié = 0,13 (une seule tache)].

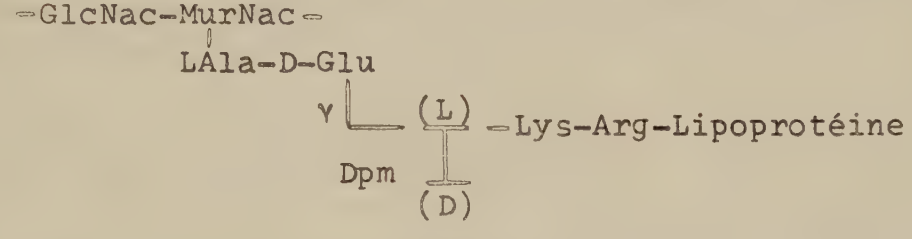
---

* E. Vilkas, A-M. Miquel et E. Lederer, Biochim.Biophys.Acta, 70, 217 (1963).

D'après son comportement au cours de la purification des parois, la substance semble liée à ces dernières d'une manière covalente. En effet, l'extraction des parois par les solvants organiques neutres, en particulier le chloroforme, ne l'ont pas solubilisée, les conditions de l'acétolyse sont nécessaires pour la séparer des parois proprement dites.

Quelques exemples de telle association des protéines avec les parois bactériennes sont connus. Parmi les bactéries Gram-positives, les parois de Streptococcus pyogenes contiennent la M.protéine (116), mais sa localisation n'est pas encore déterminée.

Chez Escherichia Coli, microorganisme Gram-négatif, Braun et coll.(114b, c) ont caractérisé une lipoprotéine liée par une liaison covalente au mucopeptide. Le point d'attache suivant est proposé par ces auteurs:



GlcNac = N-acétylglucosamine
MurNac = N-acétylmuramique

Un autre microorganisme Gram-négatif où une telle association a été mise en évidence est Pseudomonas aeruginosa (118)

Récemment, Sjoquist et coll. ont étudié la localisation de la protéine A chez Staphylococcus aureus. Il ressort de leurs travaux que cette protéine est également liée au mucopeptide (115).

Nous voudrions souligner ici les difficultés d'obtention d'un mucopeptide de M.tuberculosis complètement débarrassé de cette protéine. Tous les traitements par les enzymes protéolytiques laissent toujours subsister en quantités variables, les acides aminés ne faisant pas partie du mucopeptide proprement dit.

CHAPITRE III

RECHERCHE DE L'ACIDE POLYGLUTAMIQUE

En 1966 Migliore et Jollés (56) ont signalé la présence de quantités importantes d'acide glutamique dans les parois de Mycobactéries de souches humaines virulentes.

Dans notre laboratoire, un polymère d'acides L- et D-glutamiques enchaînés par des liaisons peptidiques α a été isolé à partir des parois de M.tuberculosis, variété hominis, souche Peurois (57) et de M.ranae (essais non publiés) (117).

Ces résultats nous ont incités à rechercher l'acide polyglutamique comparativement dans les deux souches dont nous disposions $H_{37}R_v$ (virulente) et $H_{37}R_a$ (avirulente).

Obtention de l'acide polyglutamique

Le chauffage à 70° des parois de M.tuberculosis $H_{37}R_v$ en suspension dans la potasse aqueuse 0,5N pendant 8 heures, suivie d'extraction à l'éther permet d'obtenir par centrifugation à faible vitesse, avec un rendement d'environ 2%, un produit insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques usuels.

Son hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6N pendant 20 heures à 100°C libère surtout de l'acide glutamique identifié par chromatographie sur papier, met en évidence la présence de sucres réducteurs surtout du glucose accompagné de faibles quantités d'arabinose et de galactose. Ces sucres proviennent du glucane et de l'arabinogalactane faisant partie des parois des mycobactéries (47, 60). Ils constituent environ 30% de la préparation étudiée.

L'insolubilité du produit rend impossible tout essai de dissociation de ses constituants intacts.

Nous avons soumis l'hydrolysat total du mélange à l'action de la décarboxylase d'acide L-glutamique (119).Le produit de digestion enzymatique est ensuite chromatographié sur couche mince

dans le solvant Y. La révélation à la ninhydrine permet de déceler 2 produits: l'acide γ-aminobutyrique (R_f = 0,41) formé par la décarboxylation de l'acide L-glutamique (tache très intense) et l'acide D-glutamique R_f = 0,22 (quantité plus faible). L'expérience témoin effectuée avec de l'acide L-glutamique authentique montre que dans ce cas là, la réaction enzymatique est totale.

Les parois de M.tuberculosis souche $H_{37}R_v$ semblent donc contenir un polymère d'acides L- et D-glutamiques.

Les recherches d'un polymère analogue dans les parois de la souche humaine non virulente $H_{37}R_a$ sont restées sans succès.

L'acide polyglutamique serait-il caractéristique des souches virulentes, comme l'a suggéré le travail de Migliore et coll. (56)? Cependant, cette conclusion ne peut pas être définitive, car, récemment, Wietzerbin et coll. (58) ont isolé à partir des parois du bacille Calmette-Guérin (BCG), l'acide poly-α-L-glutamique. Il est vrai que le BCG était à l'origine une bactérie pathogène pour les bovidés. Mais, M.tuberculosis $H_{37}R_a$ est également un mutant provenant de M.tuberculosis var. hominis....

Quant à la configuration des acides glutamiques identifiés, il semble que le rapport de L/D-acide glutamique dépend de l'âge de la culture, de la composition du milieu et du degré d'aération des bactéries (120).

L'acide polyglutamique a été caractérisé précédemment chez d'autres microorganismes, il semble associé avec les polysaccharides spécifiques. Ainsi, en 1937, Ivanovics et Brückner (121) isolent l'acide polyglutamique possédant des propriétés hapténiques à partir du Bacillus anthracis. Ce matériel contenant 70 à 85% d'acide D-glutamique constitue la capsule des bactéries.

Hanby et coll. (122)(123) proposent la structure exacte de ce polymère. Il s'agit d'un acide γ-poly-D-glutamique.

Différentes fractions de D- et L-glutamyl polypeptides sont isolées à partir de Bacillus licheniformis (120). Récem-

ment F.A. Troy a isolé à partir des parois Bacillus licheniformis ATCC 9945 A (souche à capsule) une poly-(γ-D-glutamyl)-synthétase qui catalyse la formation de l'acide poly-γ-D-glutamique à partir de l'acide L-glutamique (124).

Signalons également l'obtention par Guy et coll. (125) à partir des polysaccharides capsulaires des Pneumocoques du type I, d'un polymère composé d'environ 90% d'acides L- et D-glutamiques, il se retrouve associé avec les polysaccharides de plusieurs types de Pneumocoques.

Quant aux propriétés biologiques de ces polymères, leur rôle dans les phénomènes immunologiques a été reconnu depuis longtemps (126). En 1966 Goodman et Nitecki décrivent la formation chez le lapin des anticorps spécifiques en présence de l'acide poly-D-glutamique du Bacillus anthracis (127).

Par ailleurs, M. Sela et Steiner (128) ont montré que l'activité enzymatique du lysozyme peut être inhibée par les polypeptides acides, lesquels forment des agrégats avec l'enzyme. Ainsi, les souches contenant ce polymère pourrait, grâce à lui, devenir résistantes vis-à-vis de l'enzyme bactériolytique.

CHAPITRE IV

PEPTIDOLIPIDES

I. Lipide à ornithine

Certaines souches de Mycobactéries contiennent un peptidoglycolipide caractéristique, le mycoside C, dont la structure a été déterminée récemment (129). Il est isolé habituellement à partir de l'extrait éthéroalcoolique des bacilles (130, 131) D'après les travaux de Goren d'une part, et de Tokunaga et coll. (132), il constituerait le site récepteur du bactériophage D_4 et serait localisé dans la paroi (133).

Nous avons recherché un tel peptidoglycolipide dans la souche $H_{37}R_a$ de M.tuberculosis.

L'extrait éthéroalcoolique des cellules est concentré, puis repris par un mélange d'éther et d'eau. Une phase intermédiaire se forme alors. Elle a l'aspect d'un produit jaune-orange légèrement visqueux.

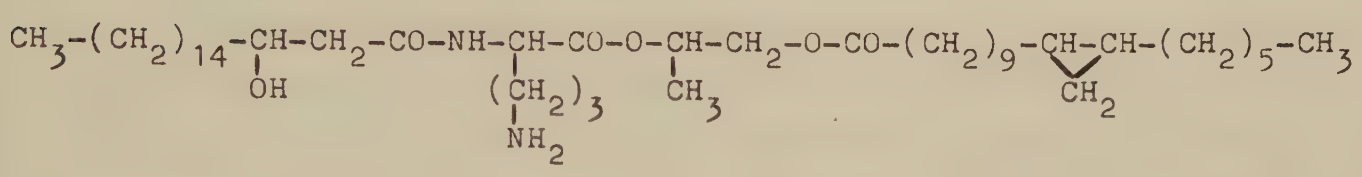
Par chromatographie préparative en couche mince dans le solvant U, nous avons isolé un produit de $R_f = 0,2$. Un échantillon de ce produit est hydrolysé par l'acide chlorhydrique 6N. Après extraction par l'éther de l'hydrolysat, l'ornithine est identifiée dans la phase aqueuse par chromatographie sur papier et à l'aide d'un autoanalyseur Beckman. Des quantités notables de lysine sont à signaler. La partie lipidique est constituée par un mélange d'acides gras (C_{16}-C_{20}).

L'ornithine a été pour la première fois caractérisée dans des préparations de phospholipides provenant de Mycobacterium avium (134).

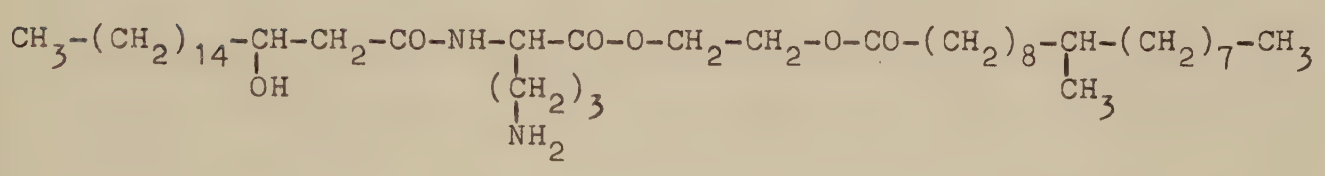
Dès 1966, Paul et Vilkas (135) signalaient la présence d'ornithine dans les lipopeptides isolés à partir de l'extrait éthéroalcoolique de plusieurs souches de Mycobactéries.

D'autre part, M.A. Lanéelle a décrit un lipide à ornithine de Brucella melitensis (I) et de BCG (II) (136a).

I.



II.



Plusieurs lipides bactériens contenant l'ornithine et parfois la lysine ont été isolés, ainsi Kawanami décrit la siolipine obtenue à partir de Streptomyces sioyaensis (137a,b) Gorchein isole un lipide analogue à partir de Rhodospirillum rubrum (138a). Le Pseudomonas rubescens et Rhodopseudomonas spheroïdes contiennent également les lipides à ornithine (138b). Dans la plupart de ces substances un acide gras hydroxylé à longue chaîne est lié par une liaison amide avec le groupement aminé en α de l'acide aminé, tandis que l'alcool gras à longue chaîne estérifie son carbonyle.

II. Mycoside C

Le mycoside C n'a pu être mis en évidence dans la souche $H_{37}R_a$ de M.tuberculosis. Comme nous l'avons déjà dit plus haut, le mycoside C semblerait être caractéristique de certaines souches de Mycobactéries. En effet, une ébauche de classification des mycobactéries en fonction des glycolipides qu'elles contiennent a été tentée (129a, b, 139, 140, 141).

Smith et coll. (129) ont signalé la présence d'un glycolipide caractéristique, le mycoside A, dans la souche atypique photochromogène M.kansasii n° 4, dont la structure établie par Gastambide-Odier est la suivante: un trisaccharide composé de 2-O-méthyl-fucose, 2-O-méthyl-rhamnose et de 2,4-di-O-méthyl-rhamnose est lié sous forme glycosidique à l'OH phénolique d'un

aglycone lipidique constitué par un phénol-glycol dont les deux hydroxyles aliphatiques sont estérifiés par deux acides gras (140).

A partir d'extraits chloroformiques de M.Kansasii chromatographiés sur acide silicique:célite (2:1), nous avons élué avec le chloroforme une substance présentant toutes les caractéristiques de solubilité des mycosides C: elle est insoluble dans l'éther et dans l'eau, soluble à froid dans le chloroforme, à chaud dans l'acétone, dans l'acide acétique et dans l'alcool. Son comportement en couche mince est identique à celui d'un mycoside C authentique extrait de M.butyricum (R_f = 0,16 dans le solvant X) (119).

Identification des constituants

1. Hydrolyses acides

Ce produit a été soumis à une hydrolyse acide totale, suivie d'extraction par l'éther. La fraction hydrosoluble chromatographiée sur papier fournit trois taches d'acides aminés qui ont pu être identifiées à la phénylalanine (R_f = 0,58), à l'alanine (R_f = 0,24) et à l'allothréonine (R_f = 0,20). Ces trois acides aminés sont caractéristiques des mycosides C (140, 141)

L'action des L- et D-oxydases d'acides aminés a permis d'établir que les acides aminés se trouvent exclusivement sous la forme D, comme dans tous les mycosides C (143, 144).

D'après le dosage quantitatif selon la méthode de Moore et Stein, modifiée par Piez et Morris, les acides aminés sont présents dans les proportions 1:2:2. Etant donné la difficulté, dans le cas des mycosides C, d'obtenir la partie lipidique dépourvue d'acides aminés, nous ne voulons pas conclure qu'il s'agit d'un pentapeptide (141), ou bien que ces proportions sont le résultat d'une hydrolyse incomplète.

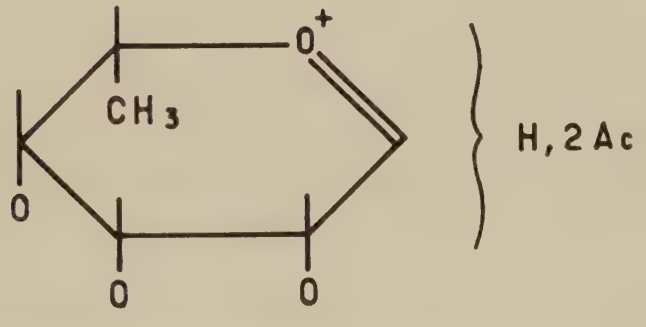
Les acides gras obtenus à partir de la phase éthérée sont constitués par un mélange assez complexe dont un représentant semble identique à celui décrit dans le mycoside C de M.butyricum; $C_{29}H_{56}O_3$ (119).

Quant aux desoxysucres, nous avons pu identifier après l'hydrolyse partielle par l'acide chlorhydrique 2N à 100° pendant 16 heures, par chromatographie sur papier dans le solvant A, le 6-désoxytalose et un di-O-méthyl-rhamnose; seul le premier sucre s'y trouve en quantité importante.

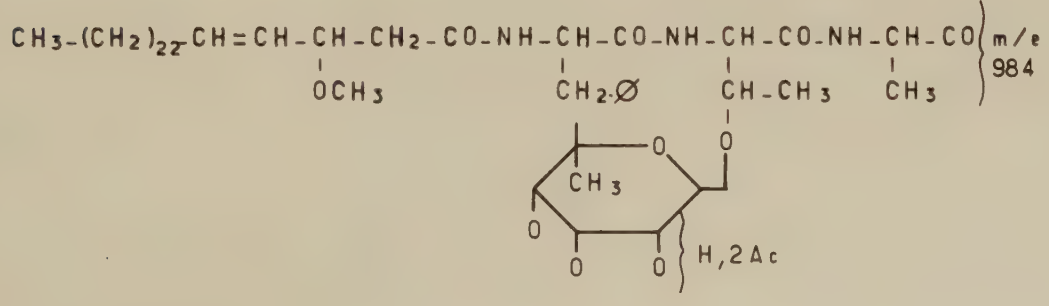
2. Spectrométrie de masse

Le mycoside intact a été soumis à la spectrométrie de masse. Le spectre obtenu n'est pas complet. Il ne contient pas de pic moléculaire mais la structure partielle du mycoside peut en être déduite. Il montre en effet, que le 6-désoxytalose contient deux groupements acétyles, comme c'est le cas dans tous les mycosides C étudiés jusqu'à présent (119).

Le pic très intense à m/e 231 peut correspondre en effet à l'ion oxonium $C_{10}H_{15}O_6$.



L'examen de ce spectre confirme en outre que la structure partielle de ce peptidoglycolipide est analogue à celle du mycoside C_b (119).



D'après ces résultats, le peptidoglycolipide isolé de M.Kansasii n° 4 semble bien un mycoside C.

La présence d'un mycoside C, dans la souche atypique, M.Kansasii contenant le mycoside A, paraissait à priori surprenante. La culture utilisée pour son isolement a été examinée par le Professeur Smith, à Wisconsin, et selon ses observations, elle comportait deux types de cellules, donc, semblait contaminée.

La séparation de ces deux types de cellules à savoir:

a cellules à "point noir central" caractéristiques d'après Fregnan Smith et Randall (141) Fig. 18.

b cellules à large centre brun, considérées par ces auteurs comme une variation du même type de bactéries (141) Fig. 19.

ainsi que l'étude de leurs caractères culturels et biochimiques ont été effectuées par Melle Zissman, dans le Service de Microbiologie de notre Institut.

Les colonies cultivées sur milieu adequat ont été examinées au microscope stéréoscopique et photographiées. Elles présentent bien les deux formes spécifiques d'une mycobactérie photochromogène décrites plus haut:

a variété à point noir central

b variété à large centre brun.

Par ailleurs, ces deux variétés possèdent des caractères biochimiques conformes à ceux définis par "Subcomitee on Mycobacteria" (146) pour Mycobacterium Kansasii.

L'examen chimique des deux types de bactéries a permis de constater qu'elles contenaient toutes les deux le mycoside C. Les deux types de mycosides peuvent coexister dans la même souche et la classification des différentes souches en fonction de leurs constituants glycolipidiques doit être envisagée avec prudence.

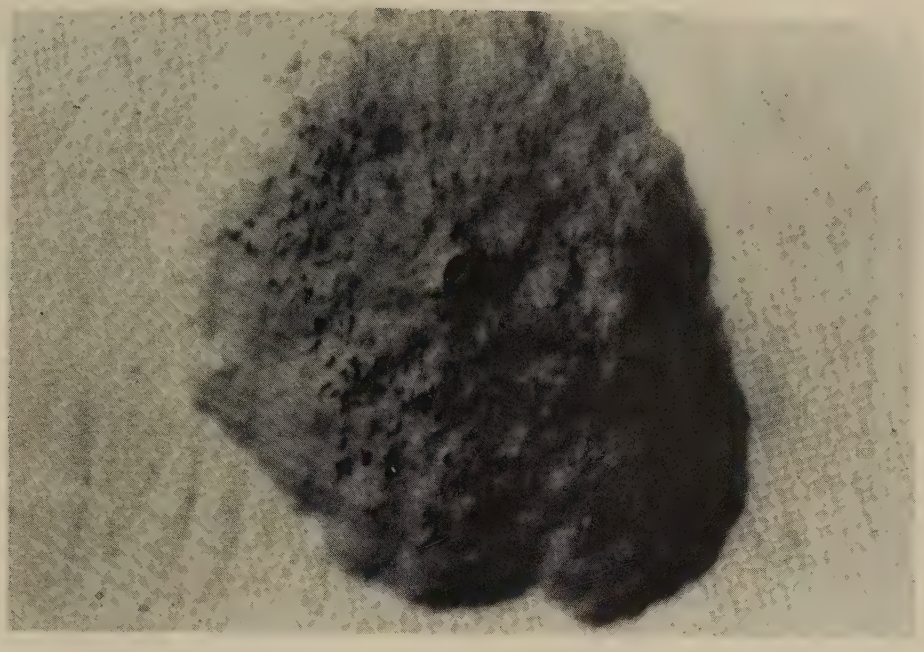


Fig. 18
Cellule à point noir central

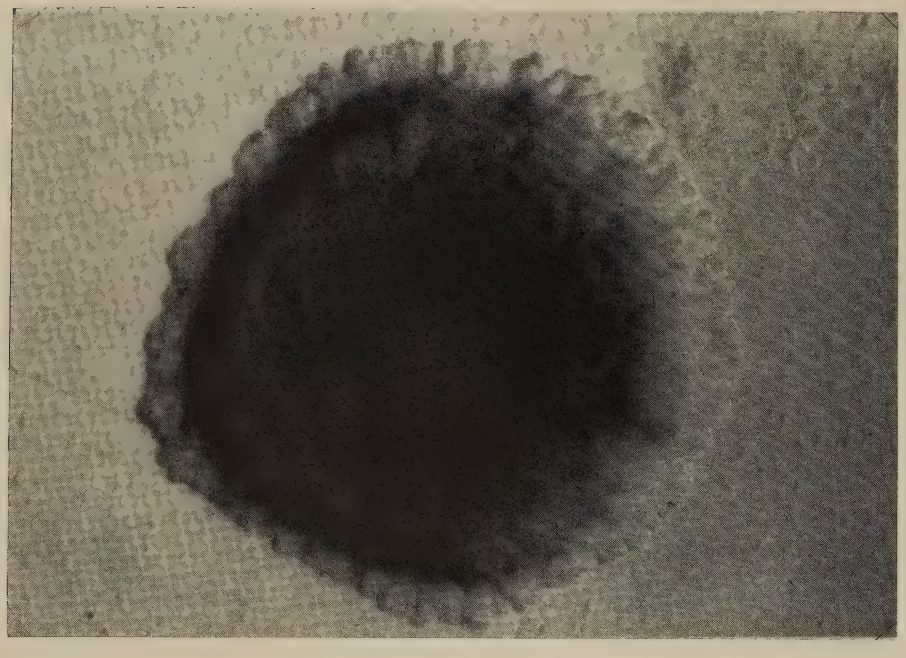


Fig. 19
Cellule à large centre brun

CHAPITRE V

INFLUENCE DE LA D-CYCLOSERINE SUR LA BIOSYNTHESE DES CIRES D

Strominger et coll. (147) ont démontre que l'action inhibitrice de la D-cyclosérine sur la biosynthèse de la paroi bactérienne s'exerce au niveau de deux enzymes:

a D-alanine racémase qui racémise la L-alanine en D-alanine

b D-alanyl-D-alanine synthétase qui catalyse la formation du dipeptide D-alanine-D-alanine.

La D-alanine faisant partie de différents constituants des mycobactéries tels que les Cires D ou les Mycosides C, David et coll. (149) suggèrent que la D-cyclosérine inhibe la biosynthèse de ces hétéropolymères.

En effet, d'après leurs travaux, la D-cyclosérine semble inhiber la biosynthèse des Cires D chez M.tuberculosis $H_{37}R_a$. Parallèlement, ces auteurs signalent l'isolement à partir de l'extrait éthéro-alcoolique des cellules d'un nouveau lipide contenant l'arabinose, le galactose, l'acide mycolique, l'acide diaminopimélique et la galactosamine.

En vue d'étudier la structure de ce nouveau lipide, nous avons répété l'expérience de David:

- deux lots ont été cultivés sur milieu Proskauer et Besk modifié*:

le premier pendant 4 semaines à 37°

le second dans les mêmes conditions, mais 10 jours en présence de D-cyclosérine. L'antibiotique est ajouté à raison de 20 γ par ml de milieu. Il atteint la concentration de 2.10^{-4}M.

---

* Les cultures ont été effectuées dans le Service de Microbiologie de l'Institut.

- les cellules sont alors récoltées par centrifugation, lavées abondamment à l'eau distillée, puis séchées.

- les lipides du lot témoin traité par l'antibiotique sont extraits selon la méthode d'Anderson modifiée par Asselineau (131)

le fractionnement comprend l'extraction des cellules par l'alcool-éther à parties égales, suivie d'un épuisement du résidu bacillaire au moyen de chloroforme.

A. Extrait éthéro-alcoolique

L'extraction par le mélange d'alcool et d'éther (1:1, v/v) des bacilles fournit une fraction qui est séparée ensuite en deux parties: éthérosoluble et hydrosoluble. Par des ébullitions répétées de l'éthérosoluble avec de l'acétone bouillante nous obtenons une fraction insoluble qui est en grande partie constituée par des phospholipides. C'est dans cette dernière que David a signalé la présence du "new-lipid". Or, l'examen de cette fraction acétonoinsoluble dans le cas du lot traité par l'antibiotique montre qu'elle est composée de phosphatidyl-inosito-mannosides. C'est Anderson qui, dès 1930 a signalé la présence d'inositol et de mannose dans les produits d'hydrolyse des phosphatides du bacille tuberculeux (150a,b) Vilkas et Lederer ont identifié dans différentes souches de Mycobactéries un phosphatidylinositol et ses dérivés contenant de une à cinq moles de mannose (151a,b), leurs structures ont été proposées (152).

Des faibles quantités d'acides aminés comme l'acide aspartique, l'alanine, l'acide glutamique sont également décelée (voir tableau dans la partie expérimentale p. 128.

Les mêmes composés se retrouvent dans l'extrait provenant du lot témoin.

B. Extrait chloroformique

Les extraits chloroformiques sont évaporés jusqu'à siccité puis repris par l'acétone à chaud. Les fractions insolubles dans l'acétone bouillante constituent les Cires D. Les quantités de Cires D brutes isolées à partir du lot témoin et du lot traité, sont conformes aux observations d'Asselineau (153) selon lesquelles les souches avirulentes contiennent peu de Cires

D par rapport aux souches virulentes: $H_{37}R_a$ = 2%, $H_{37}R_v$ = 7%.

Les Cires D intactes solubilisées dans le chloroforme sont chromatographiées en couche mince dans le solvant U. Les Cires D ne migrent pas dans ces conditions (154). La révélation par l'acide sulfurique permet de les détecter sur la ligne de départ. Le réactif de Dittmer (155) spécifique des composés phosphorylés indique la présence de petites quantités de phospholipides.

Les Cires D brutes sont hydrolysées par l'acide chlorhydrique à concentrations variables. Leurs constituants sont identifiés par chromatographie sur papier ou à l'aide d'un autoanalyseur d'acides aminés.

Il s'agit de l'arabinose, du galactose, du mannose (en petite quantité), du glycérol et de l'inositol, de l'éthanolamine, de la glucosamine, de l'acide muramique, de l'acide glutamique, de l'acide diaminopimélique et de l'alanine.

Les acides gras sont analysés après l'hydrolyse alcaline. Leurs esters méthyliques sont chromatographiés en couche mince dans le solvant R en présence de témoins authentiques d'esters mycoliques et, examinés par spectrométrie de masse. Deux types d'esters sont identifiés: d'une part, un mélange d'esters gras allant de C_{14} à C_{19} provenant des phospholipides contaminant les Cires D, d'autre part, d'esters mycoliques.

Le phospholipide en quantité majeure donnant sur couche mince la réaction positive à la ninhydrine (R_f = 0,6, dans le solvant U) est récupéré par chromatographie préparative dans les mêmes conditions.

Son hydrolyse acide libère les acides gras et, comme fraction hydrosoluble, du glycérol, de l'acide phosphorique et de l'éthanolamine.

Le glycérol est identifié par chromatographie sur papier dans le solvant A (R_f = 0,46). L'éthanolamine est d'abord caractérisé par électrophorèse ensuite par chromatographie sur papier dans le solvant A (R_f = 0,32). Le produit isolé est une phosphatidyl-éthanolamine. Subrahmanyan (156), le premier, a signalé la présence de phosphatidyl-éthanolamine dans quatre espèces de Mycobactéries (M.607, M.phlei, M.avium et $H_{37}R_{v4}$).

D'après nos résultats le lot traité par la D-cyclosérine et le lot témoin possèdent pratiquement les mêmes constituants. Nous n'avons pas pu mettre en évidence le "nouveau lipide" dans l'extrait éthéroalcoolique du lot traité par l'antibiotique.

Nous envisageons l'étude de l'influence de la D-cyclosérine sur la biosynthèse du Mycoside C (peptidoglycolipide contenant en plus de la D-phénylalanine, la D-allothréonine, également la D-alanine).

DISCUSSION DES RESULTATS - CONCLUSION

D'après les résultats obtenus par différents auteurs et par nous-mêmes (47, 60a,b, 157) , nous pensons pouvoir admettre comme éléments structuraux des parois de toutes les souches de M.tuberculosis:

1°) un lipopolysaccharide composé d'un mycolate d'arabinogalactane

2°) un mucopeptide caractéristique de toutes les parois bactériennes, composé d'un nombre limité d'acides aminés: l'acide meso α,α-diaminopimélique, la D- et L-alanines, et l'acide D-glutamique, et deux sucres aminés: l'acide N-glycolyl muramique et la N-acétylglucosamine.

De faibles quantités d'autres acides aminés: acide aspartique, glycine, valine, leucine, phénylalanine, ont également été décelées, ils font partie de la lipoprotéine que nous avons pu mettre en évidence.

Les préparations de parois étudiées contiennent également d'autres constituants:

- un glucane (dans toutes les souches étudiées)
- un acide polyglutamique (dans certaines souches)
- un lipide à ornithine ($H_{37}R_a$).

Au cours de notre travail, nous nous sommes attachés surtout à l'étude du mycolate d'arabinogalactane et du glucane.

Ainsi, nous avons pu confirmer que dans les parois, l'acide mycolique estérifie un arabinofurannose terminal, non réducteur de l'arabinogalactane, comme Azuma et Yamamura (96) d'une part, et Acharya (97) d'autre part, l'ont précisé pour les lipides liés.

Nous avons, par ailleurs, pu démontrer que le galactose se trouve dans ce polysaccharide sous forme furannosique. En effet, parmi les produits de sa dégradation partielle, un di-

saccharide a pu être isolé, et sa structure déterminée avec certitude. Il s'agit d'un 6-O-β-D-galactofurannosyl-D-galactose (158).

Les spectrométrie de masse et spectrographie de résonance magnétique ont été largement utilisées.

En conclusion, l'arabinogalactane des parois de M.tuberculosis $H_{37}R_v$ et $H_{37}R_a$ possède une structure ramifiée:

il est constitué par les motifs à répétition comportant environ 17 unités dont 5 molécules d'arabinofurannose pour 2 molécules de galactose, toutes les deux probablement sous forme furannosique. La plupart des arabinofurannoses sont liés en 1-5, des liaisons en 1-2 et 1-3 ont pu être également démontrées. Les galactoses sont liés en 1-6. Rappelons qu'au moment où nous avons entrepris ce travail, seuls les polysaccharides des parois de BCG avaient été étudiés par Misaki (47).

La structure partielle proposée par cet auteur comporte les chaînes d'environ 9 oses, où les arabinofurannoses sont liés surtout en 1-5 et les galactopyrannoses en 1-4.

Bien que rare dans la nature, le D-galactofurannose a été isolé à partir de quelques polysaccharides bactériens dotés souvent de propriétés biologiques intéressantes, notamment de la fraction antigènique du lipopolysaccharide de Salmonella friedenau (90b), des polysaccharides spécifiques de Pneumococcus (90a), de celui de Mycoplasma mycoïdes (73) et du galactane de Penicillium charlesii (91).

Un mycolate d'arabinogalactane analogue a été isolé à partir des Cires D des mycobactéries (182). D'après les résultats obtenus au laboratoire, il semble comporter davantage de ramifications: sa perméthylation fournit une proportion plus importante de 2,3,5-arabinofurannose par rapport aux autres dérivés méthylés, il contient également davantage d'acides mycoliques.

Etant donné que les Cires D sont formées par autolyse des parois (38), il faut admettre que ces dernières ne sont pas homogènes, elles semblent être constituées par des frag-

ments plus ou moins riches en lipides.

Par ailleurs, les lipides liés étudiés par de nombreux auteurs (96, 100,101) et considérés comme une structure indépendante semblent correspondre au mycolate d'arabinose ou arabinobiose libéré par hydrolyse acide ménagée à partir du mycolate d'arabinogalactane.

Il nous semble également important de rappeler ici, les travaux de Takeya et coll. (46b) qui isolent à partir des parois de Mycobacterium phlei la "basal layer" par un traitement alcalin. Pour ces auteurs la différence principale entre les parois et la couche basale réside en leur teneur respective en lipides: ainsi, les parois riches en lipides s'apparentent à celles des bactéries gram-négatives, tandis que la couche basale ressemble aux parois des bactéries des gram-positives.

Or, il nous semble que la "basal layer" formée par hydrolyse alcaline du mycolate d'arabinogalactane constitue la paroi déjà partiellement dégradée.

Nous avons pu isoler à partir de deux souches de mycobactéries ($H_{37}R_a$ et BCG) un α-glucane pratiquement pur, et avons déterminé la structure de celui de $H_{37}R_a$. Le polysaccharide est ramifié, la plupart des liaisons glycosidiques étant en 1-4, il existe toutefois des unités liées en 1-6.

Misaki et Yukawa ont étudié un glucane du BCG, il possède une structure analogue (47).

Nos résultats ne permettent pas de conclure si ce polysaccharide fait effectivement partie des parois, ou se trouve dans les préparations étudiées à cause de son insolubilité dans les solvants utilisés pour la purification des parois.

Une remarque s'impose à propos de la stabilité des polysaccharides étudiés en milieu acide. L'hydrolyse par l'acide trichloroacétique fournit des quantités importantes d'arabinose et de galactose libres, le glucose n'étant pratiquement pas libéré. Ce résultat constituerait une preuve supplémentaire quant à la conformation furannosique de l'arabinose et du galactose.

Signalons que Kotani indique la présence , dans les parois de $H_{37}R_v$, d'un troisième polysaccharide en quantité mineure: un arabinomannane (159). Dans les souches étudiées, nous n'avons pas pu le déceler.

Nous avons isolé un polymère d'acides L- et D-glutamiques. Nous avons vérifié que la souche avirulente, n'en contenait pas.

Le même polymère a été également obtenu au laboratoire à partir d'une souche de M.tuberculosis var.hominis Peurois (57) Toutefois, nous ne pouvons pas généraliser sa localisation dans les souches virulentes car, Wietzerbin et coll. ont isolé récemment, un polymère d'acide L-glutamique, du BCG (58).

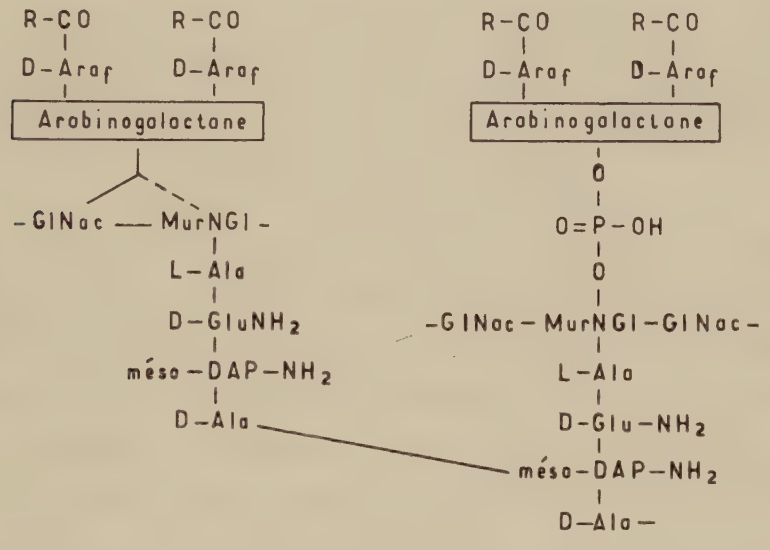
Quant à son rôle biologique, il pourrait, d'après Sela et Steiner (128) "défendre la bactérie contre les enzymes bactériolytiques". En effet, ces auteurs démontrent que l'activité du lysozyme peut être inhibée par les polypeptides acides, en formant des agrégats avec l'enzyme.

La présence de l'acide polyglutamique pourrait donc être une des causes de la résistance du Mycobacterium vis-à-vis du lysozyme.

Ce travail nous a permis également de déterminer la composition du mucopeptide, et de vérifier que l'acide muramique se trouve là aussi sous forme N-glycolylée, comme l'avaient démontré J-F.Petit, A. Adam, J. Wietzerbin-Falszpan, P. Sinaÿ, D.W. Thomas et E. Lederer, dans quelques autres souches de mycobactéries (162).

Les structures détaillées du disaccharide (N-acétyl-glucosamine — N-glycolyl-muramique) et du tétrapeptide (L-Ala-D-glu-mDpm-D-Ala) provenant des parois de M.smegmatis ont été déterminées par J-F. Petit et coll. (160) . Nous insistons cependant sur la présence constante dans nos préparations, de 0,2 molécules de glycine et 0,4 molécules d'acide aspartique (par rapport à une molécule de m-Dpm). Ces acides aminés pourraient constituer les ponts interpeptidiques. En effet, Kotani (159) en étudiant le mucopeptide de $H_{37}R_v$ signale qu'une petite quantité d'acide glutamique n'est pas amidée mais substituée par la glycine.

La nature de la liaison entre le mycolate d'arabinogalactane et le mucopeptide n'est pas entièrement élucidée. Liu et Gotschlich ont isolé à partir de M.butyricum, le 6-phosphate d'acide muramique (163), au laboratoire un tel phosphate a été obtenu à partir des Cires D; d'autre part, Kanetsuna et coll. ont confirmé la présence du phosphate d'acide muramique dans plusieurs souches de mycobactéries. Ces auteurs (164) proposent deux liaisons possibles (Fig. 20).



R-CO: résidu d'acides mycoliques
D-Ara_f: D-arabinofurannose
GlNac: N-acétylglucosamine
MurNGl: N-glycolylmuramique

Fig. 20

La liaison covalente entre les deux polymères au niveau de l'acide muramique ou de la glucosamine serait également responsable de la difficulté d'attaque des mycobactéries par le lysozyme (voir plus haut, l'acide polyglutamique). A ce propos, nous voudrions rappeler la solubilisation partielle par cet enzyme, du mucopeptide obtenu par hydrolyse trichloroacétique des parois et contenant encore des sucres neutres résiduels.

Comme nous l'avons déjà signalé, pratiquement tous les acides aminés des protéines ont pu être décelés en quantités mineures dans les préparations des parois étudiées; ils semblent provenir d'une lipoprotéine qui accompagne la paroi.

Elle n'est pas libérée au cours des différentes extractions des parois, notamment par le $CHCl_3$. Seules les conditions d'acétolyse nous ont permis de l'obtenir. Ceci indiquerait sa liaison covalente avec le mucopeptide. Les digestions des parois par les enzymes protéolytiques conduisent à sa dégradation partielle.

Une lipoprotéine liée d'une manière covalente avec les parois d'E.Coli a été isolée et sa structure déterminée par Braun et coll. (114). Ces auteurs lui attribuent un rôle important dans la protection de la paroi.

En résumé, nous pensons que le mycolate d'arabinogalactane et le mucopeptide pourraient constituer une double enveloppe dont le mucopeptide formerait la couche intérieure. En effet, l'acide mycolique extérieur donne, comme l'a remarqué Takeya (46) et d'autres auteurs (157, 161) à la surface des parois, l'aspect fibreux. Les autres constituants viennent, selon les souches, consolider cette structure: il s'agit des mycosides, des lipoprotéines, des polypeptides et des différents polysaccharides (glucane, arabinomannane).

Nos différentes préparations ont été soumises aux essais biologiques; ainsi, les propriétés immunisantes des parois $H_{37}R_v$ purifiées et délipidées ont été testées par le Dr. Chedid (Institut Pasteur, Paris). Elles confèrent aux souris une protection efficace contre l'infection par Klebsiella pneumoniae caroli (38).

L'effet adjuvant du glucane,de l'arabinogalactane et du mucopeptide a été mesuré par Mme R. Ciorbaru (Institut de Biochimie, Orsay). Le glucane a un faible pouvoir adjuvant, mais se trouve être très toxique pour l'animal (cobayes).

TECHNIQUES ANALYTIQUES

Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un appareil de Kofler.

Les microdosages du carbone, d'hydrogène et de l'azote ont été effectués au Service de Microanalyse du C.N.R.S. (Gif-sur-Yvette).

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés avec un polarimètre Quick de Roussel et Jouan (raie D du sodium).

Les spectres infrarouges ont été enregistrés à l'aide d'un appareil "Infracord" de Perkin-Elmer.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été effectués soit dans le Service de l'Institut avec un appareil Varian A 60 (Mme Allais), soit dans le laboratoire de Chimie Analytique, Université d'Utrecht, avec un appareil Varian H A 100. Dans les deux cas, le signal du triméthylsilane a été pris comme référence.

Les spectres de masse ont été mesurés à l'aide d'un appareil MS 9 (AEI) comportant le système d'introduction directe, au Service de Spectrométrie de Masse de cet Institut, dirigé par le Dr. B. Das, et au Laboratoire de Chimie Analytique à l'Université d'Utrecht.

Dosages colorimétriques

Les sucres réducteurs sont dosés soit par la méthode au phénol-acide sulfurique (165), soit par la technique de Wilson (66). Les sucres aminés sont dosés selon la méthode d'Elson-Morgan (166) modifiée par Rimington (167). Le dosage du phosphore est fait selon King (168). L'acide glycolique selon Calkins (169).

TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

1. Chromatographie sur colonne

Les adsorbants utilisés sont, soit le trisilicate de magnésium, soit l'acide silicique Mallinckrodt. Ces adsorbants sont mélangés avec de la célite en proportion 2:1. La quantité d'adsorbant est en général égale à 40 ou 50 fois le poids du produit à chromatographier. Les élutions sont faites par les solvants appropriés.

2. Chromatographie sur échangeurs d'ions

Les analyses qualitatives et quantitatives d'acides et de sucres aminés ont été effectuées à l'aide d'un autoanalyseur de Beckman, Modèle 120 B*, quelques analyses ont été effectuées à l'aide de l'autoanalyseur Unichrom.

3. Chromatographie sur papier

Les chromatographies analytiques et préparatives sur papier Whatman n° 1 ou 3 sont effectuées dans les mélanges de solvants:

A. n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5)
B. n-butanol-pyridine-eau (6:4:3)
C. n-butanol-éthanol-eau (10:1:2)
D. acétate d'éthyle-pyridine-eau (2:1:2)
E. phénol-eau-ammoniaque (80:20:1)
F. butanone saturée contenant 2% NH_4OH
G. acétone-eau (9:1)
H. méthanol-acide formique-eau (ascendante) (85:15:5)
I. n-butanol-éthanol-eau-ammoniaque (40:10:49:1)
J. acétate d'éthyle-pyridine-n-butanol-acide butyrique-eau (10:10:5:1:5)
K. isopropanol-eau (8:2)
L. acétate d'éthyle-acide acétique-eau (9:2:2)
M. acétate d'éthyle-pyridine-eau (10:4:3)
N. n-butanol-eau-acétone-ammoniaque
O. n-butanol-éthanol-eau (5:1:4)

---

* Je remercie tout particulièrement M. J-C. Massot pour les nombreuses analyses effectuées.

Les révélations utilisées sont:

- le phtalate acide d'aniline pour les sucres réducteurs et leurs dérivés méthylés (170).

- le nitrate d'argent alcalin (69) et l'acide periodique benzidine (171) pour les polyols

- la ninhydrine pour les composés aminés

- le réactif d'Elson Morgan pour les sucres aminés (166)

- le réactif de Sharon pour les sucres aminés N-acylés (172)

- le réactif molybdique pour les esters phosphoriques (173-175)

- le réactif à la diphénylamine, aniline acide phosphorique (77) et le chlorure de triphényltétrazolium (69) pour les sucres réducteurs et leurs dérivés méthylés.

4. Chromatographie en couche mince

Les chromatographies en couche mince sont effectuées sur des plaques commerciales de Gel de Silice Merck (F 254) ou Schleicher et Schüll (F 1500 LS 254), sur des plaques de cellulose (F 1440) Schleicher et Schüll, et sur des plaques de Silicagel G Merk préparées au laboratoire.

Les solvants utilisés sont:

R. éther de pétrole-éther	(9:1)
S. benzène-méthanol	(96:4)
T. acétone-eau-ammoniaque	(250:3:1,5)
U. chloroforme-méthanol-eau	(70:35:7)
V. méthanol-acide formique-eau	(85:15:5)
W. n-propanol-eau	(70:10)
X. chloroforme-méthanol	(95:5)
Y. phénol-eau	(75:25)

Les révélateurs utilisés sont les suivants:

- l'acide sulfurique à 50%

- la rhodamine B pour les esters gras (176)

- le réactif de Dittmer pour les composés phosphorylés (155)

- les vapeurs d'iode pour les substances lipidiques

- la ninhydrine pour les composés aminés

- le phtalate d'aniline pour les sucres réducteurs et pour les sucres méthylés (170)

- le nitrate d'argent alcalin pour les polyols (69)

- le réactif de l'ammoniumsulfate pour les sucres aminés (177, 178)

- l'hydroxamate pour le test des esters (95)

Pour révéler les phospholipides sur couche mince, on peut utiliser successivement la ninhydrine puis le réactif de Dittmer ce qui permet de situer les substances phosphorylées et aminées sans ambiguité.

5. Chromatographie sur gel

Les gels suivants ont été utilisés:

- les Sephadex G-15 et G-25 (fine)(Pharmacia Uppsalen Sweden).

Les conditions de ces chromatographies seront indiquées dans la partie expérimentale.

Les solutions organiques ont été concentrées sous pression réduite, les solutions aqueuses ont été lyophilisées.

6. Chromatographie en phase gazeuse

Les chromatographies en phase gazeuse ont été faites soit à l'aide d'un appareil Chromagaz CG1 "Profitt" muni d'un détecteur à ionisation de flamme, le gaz vecteur étant l'azote, soit à l'aide d'un appareil Intersmat, le gaz vecteur étant l'argon. D'autre part, les chromatographies en phase gazeuse faites à l'Université d'Utrecht ont eté effectuées sur un appareil F et M modèle 700, avec un détecteur à ionisation de flamme.

a. Sucres méthylés (179).- Colonne 2 m x 6 mm, phase stationnaire: polysuccinate de butanediol à 15%, célite: 80-100 mesh, entrée: 185°, four: 170°, sortie: 205°, vitesse de l'enregistrement: 8,5 mm/2 min., sur Intersmat.

b. Alditols partiellement méthylés et acétylés (68).- Acétates d'alditols colonne 2 m x 4 mm, phase stationnaire: 3% ECNSS M sur du chromosorb Q, températures: entrée: 185°, four: 170°, sortie: 205°, vitesse de l'enregistrement: 8,5 mm/2 min.

c. Dérivés triméthylsilylés.- Colonne 2,70 m x 3,2 mm, phase stationnaire: 3% OV 17 sur du chromosorb W 80-100 mesh, températures: entrée: 290°, four: 227°; sortie: 310°, les débits H_2, air et N_2 sont: 45 ml/min., 375 ml/min., 18 ml/min.

Electrophorèse

Pour identifier l'éthanolamine, on effectue une électrophorèse sur papier Whatman n° 3, dans un tampon [pyridine-acide acétique-eau (100:3,5:896,5)], pH = 6,4, sous une tension de 300 volts pendant 3 heures. Le révélateur utilisé est la ninhydrine.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I

PREPARATION DES PAROIS

Isolement

$H_{37}R_v$

La souche $H_{37}R_v$ de Mycobacterium tuberculosis var.hominis a été cultivée à l'Institut Pasteur de Lille, sur milieu de Sauton, pendant 3 semaines à 37°C. Les bactéries sont tuées par l'addition de phénol dans le milieu,jusqu'à la concentration finale de 2%. La suspension dans le phénol est agitée pendant quarante huit heures à la température ambiante. Les bactéries sont ensuite séparées par filtration et lavées abondamment à l'eau distillée.

Les parois sont obtenues par cryobroyage des cellules en présence de billes d'acier (0,16 mm de diamètre). Les billes et les bactéries intactes sont éliminées par une centrifugation à 600 g, elles sédimentent à cette vitesse.

La suspension obtenue est ensuite centrifugée à 12000 g pendant 30 minutes. Les parois ainsi préparées sont lavées à plusieurs reprises par l'eau distillée.

$H_{37}R_a$

Cette souche a été cultivée dans le Service de Microbiologie de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, sous la direction de Mlle E. Zissman. La culture s'effectue sur milieu de Sauton, pendant 4 semaines à 37°, les bacilles sont également tués par l'addition de phénol, puis séparés du milieu de culture par filtration sur papier filtre et lavés à l'eau distillée, plusieurs fois.

Les cellules sont homogénéisées dans un Potter, en solution saline à 5% et elles sont cassées par 3 différentes méthodes:

1) Désintégration ultrasonique dans un appareil de Branson. Dans un bécher en aluminium maintenu à 0°, 80 ml de cellules en suspension sont désintégrées par les ultrasons de 5 minutes en 5 minutes, pendant une demi-heure. L'opération est suffisante pour ouvrir pratiquement la cellule.

2) Rupture de la cellule dans un appareil de Ribi: la suspension est introduite par petites quantités dans le cyclindre de l'appareil, la pression du piston de 30.000 p.s.i s'exerçant, provoque la rupture de la bactérie.

3) Désintégration de la cellule par la presse de French: les bacilles en suspension sont soumis à une pression de 7.500 p.s.i à 4°. L'opération est répétée une deuxième fois.

Nous avons adopté cette dernière méthode pour son rendement élevé.

Les cellules intactes sont éliminées par centrifugation à 2.500 t/min. Les parois sont ensuite obtenues par centrifugations à 12000 t/min., de la solution surnageante, pendant une demi-heure. Elles sont ensuite lavées plusieurs fois à l'eau distillée.

Délipidation

Les cellules ou les parois sont délipidées à la température ambiante avec une série de solvants. Nous avons utilisé l'ordre suivant:

1) 10 g de cellules sont mis en suspension dans 500 ml d'acétone. Les extractions répétées avec ce solvant 3 fois 2 litres (jusqu'à l'obtention d'un extrait incolore) donnent après filtration un résidu.

2) Ce résidu est à son tour extrait par le mélange d'alcool et d'éther (1:1, v/v) 2 fois 2 litres, l'extrait est filtré et le produit restant est soumis à une nouvelle délipidation par:

3) le mélange chloroforme-méthanol (2:1) 3 fois 2 litres.

Ces solvants enlèvent respectivement 0,665 g, 0,480 g et 0,420 g de lipides.

Hydrolyse des parois brutes

5 mg de parois sont hydrolysés par 0,7 cc d'acide chlorhydrique 6N pendant 18 heures à 105°. L'acide est ensuite éliminé par lavages répétés à l'eau distillée et évaporation sous vide. L'hydrolysat est chromatographié sur papier Whatman n°1 dans le solvant A. Après révélation du chromatogramme par la ninhydrine, les acides aminés suivants sont identifiés: Ala, Glu, DPM, ainsi que des quantités notables d'Asp, Gly, Thre, Ser, Val, Leu, Ileu, Phe.

Purification

1. Pronase

200 mg de parois contaminées par des résidus protéiniques sont incubés avec 20 mg de pronase, dans 30 ml de tampon phosphate (0.02M) à pH = 8, durant 48 heures, à 37° sous agitation magnétique. Le résidu de la digestion enzymatique (150 mg) séparé par filtration sur verre fritté, est lavé abondamment à l'eau distillée et à l'acétone.

2. Trypsine

200 mg de parois brutes sont mis en suspension dans 50 ml de tampon phosphate 0.01M (pH = 8) avec 20 mg de trypsine (Difco) à 37°, 4 cc de toluène sont ajoutés afin d'éviter toute contamination, et la suspension est agitée pendant deux heures. Après centrifugation à 1.000 t/min., on obtient dans la solution surnageante les parois. Ce surnageant est centrifugé pendant 30 minutes à 12000 t/min. et les parois sédimentent. Elles sont lavées trois fois par centrifugation avec le tampon phosphate, puis homogénéisées dans l'eau et dialysées contre l'eau dans un sac de cellophane à 4° pendant une nuit.

Etude des constituants des parois

Des échantillons de 2 mg de parois purifiées sont hydrolysés:

1) par l'HCl 1,5N à 100°, pendant 18 heures, en vue d'identifier les oses neutres,

2) par l'HCl 6N à 100° pendant 18 heures. Cette hydrolyse sert à déterminer les acides aminés,

3) par l'HCl 4N à 100° pendant 8 heures, pour identifier les sucres aminés.

Les hydrolysats sont extraits par l'éther et les phases aqueuses sont concentrées, et lavées plusieurs fois par l'eau distillée.

1) Les sucres

Les sucres neutres sont identifiés par chromatographies analytiques sur papier Whatman n°1 dans les solvants A, B et C. La révélation par le phtalate acide d'aniline permet de voir trois taches correspondant à l'arabinose, au glucose et au galactose. Les R_{Glu} respectifs sont les suivants dans le solvant B, Ara R_{Glu} = 1,1; Gal R_{Glu} = 0,9.

Dosage de Wilson: une partie de chaque hydrolysat (HCl2N) est déposée à l'aide d'une micropipette graduée en λ sur du papier Whatman n°1 et chromatographiée dans les solvants B (40 heures) et C (72 heures), en présence de solutions étalons (glucose, galactose, arabinose).

2 et 3) Acides aminés et Sucres aminés

Les acides aminés et les sucres aminés suivants sont identifiés par chromatographie analytique sur papier Whatman n°1, dans le solvant A: acide diaminopimélique (R_f = 0,07), acide glutamique (R_f = 0,2), alanine (R_f = 0,26), glucosamine (R_f = 0,16) et acide muramique (R_f = 0,29).

Leurs dosages quantitatifs sont faits à l'aide d'un autoanalyseur Beckman (modèle 120 B, résine PA 28, tampon: citrate de sodium, pH = 3,14) par chromatographie sur échangeurs d'ions

selon Moore et Stein (50), méthode modifiée par Piez et Morris (51). On voit les pics correspondants à l'acide aspartique, l'acide glutamique, la glycine, l'alanine et l'acide diaminopimélique (on note aussi des petits pics correspondants à la serine, valine, phénylalanine et leucine). Les volumes d'élution respectifs sont: Ve = 86,7; 132; 176,8; 190,4; 283,9 ml.

Les pics des sucres aminés suivants sont caractérisés: acide muramique (Ve = 119 ml), glucosamine (Ve = 328,1 ml). Coefficient de correction de l'acide muramique: 1,7.

L'hydrolysat par l'HCl 4N des parois purifiées est également chromatographié sur papier dans le solvant J, et en couche mince de Silicagel Merck dans le solvant W, en présence de témoins authentiques. Une bonne séparation entre les deux sucres aminés permet de noter dans l'hydrolysat la présence de galactosamine à l'état de traces. R_f glucosamine = 0,22; R_f galactosamine = 0,16 dans le solvant W.

Dosage de l'acide glycolique 1 mg de parois est hydrolysé par l'acide sulfurique 2N pendant 2 heures à 100°.

L'acide glycolique libéré est dosé par la méthode de Calkins (169).

Réactif d'Eegrive (180)

0,01% de 2,7-dihydroxynaphtalène dans l'acide sulfurique concentré.

A 0,2 ml de la solution à doser, contenant 10-100 µg d'acide glycolique, on ajoute 2 ml de réactif d'Eegrive, les tubes étant refroidis dans un bain d'eau glacée. Ils sont ensuite agités, bouchés et maintenus pendant 20 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement à la température ambiante on ajoute 4 ml d'acide sulfurique 2N et les tubes sont de nouveau agités.

Une coloration rouge apparaît. La mesure des densités optiques est effectuée à 530 mu.

Les parois contiennent sensiblement 0,46% d'acide glycolique.

4) Phosphore

Le dosage du phosphore est effectué sur 3 mg de produit. Le résultat est de 0,13%.

5) Analyse élémentaire des parois

C = 42,92 H = 7,97 N = 5,47.

CHAPITRE III

DEGRADATION DES PAROIS

I. Traitement par le chlorhydrate de phénylhydrazine (52)

5 mg de parois sont mis en suspension dans 10 ml d'eau contenant 40 mg de chlorhydrate de phénylhydrazine et 60 mg d'acétate de sodium; la solution est amenée à pH = 7 par l'addition de NH_4OH et laissée sous agitation pendant 30 minutes à 80°. Après centrifugation à 12.000 t/min., le résidu est lavé plusieurs fois à l'eau et le surnageant contenant encore des sels est filtré sur colonne d'Amberlite MB_3. L'analyse quantitative des sucres est effectuée sur le résidu. Il reste 6,4% d'oses neutres.

II. Extraction par le phénol (54)

100 mg de parois sont traités par 15 ml de phénol à 45%, pendant 30 minutes à 70°C, sous agitation magnétique. Le résidu est séparé de la solution surnageante par centrifugation, et soumis au même traitement par le phénol pendant 1 heure.

- L'insoluble est ensuite abondamment lavé à l'eau distillée et à l'acétone. 2 mg de ce produit sont hydrolysés par l'HCl 1,5N à 100° pendant 4 heures et chromatographiés sur papier Whatman n°1 dans le solvant B, des grandes quantités d'arabinose et de galactose R_{Glu} = 1,1, R_{Glu} = 0,9 sont mises en évidence.

2 mg de l'insoluble sont hydrolysés par HCl 6N et chromatographiés sur échangeurs d'ions selon Piez et Morris (voir tableau III)

- Les phases organiques provenant de deux extractions sont réunies et additionnées de 150 ml de MeOH à -10°, et le mélange

est maintenu en contact pendant 48 heures. Il se forme un précipité qui est séparé par centrifugation. Son hydrolyse (2 mg) par l'acide 6N (0,5 ml) à 105°, suivie de chromatographie sur papier Whatman n°1 dans le solvant A, et sur échangeurs d'ions à l'aide d'un autoanalyseur Beckman, indique la présence d'alanine, de proline, de valine, leucine, isoleucine phénylalanine thréonine, et de sérine.

- Les deux phases aqueuses sont dialysées contre l'eau distillée pendant 48 heures à 4 °C; après lyophilisation de la substance non dialysable, un dosage des sucres neutres indique la présence de 7,8% d'oses neutres.

III. Oxydation periodique des parois (37)

200 mg de parois sont additionnés de 60 ml de métaperiodate de Na 0,05M. La solution sous agitation magnétique est abandonnée à l'obscurité pendant 14 jours, à la température du laboratoire. Après centrifugation, l'insoluble en suspension dans 10 cc d'H_2O est réduit par 40 mg de $NaBH_4$, pendant une nuit. Le résidu est de nouveau séparé du surnageant par centrifugation puis hydrolysé par 10 cc de SO_4H_2 0,1N, pendant 24 heures, à la température ambiante.

- L'insoluble isolé, 110 mg, est lavé par l'eau et par un mélange $CHCl_3$:éther:éthanol (1:1:0,5). 1 mg de cette phase organique obtenue est hydrolysé par HCl 6N (0,5 ml) et chromatographié sur papier Whatman n°1 dans le solvant A. Elle contient des traces d'acide aspartique, d'acide glutamique et d'alanine.

- Quant au mucopeptide insoluble obtenu par ce traitement, sa composition figure dans le tableau IV (voir partie théorique). Le dosage quantitatif des sucres neutres effectué sur ce résidu indique la teneur de 1,75% d'oses dosés en arabinose.

- Le surnageant est concentré par lyophilisation (≃ 10 mg) hydrolysé par HCl 3N, chromatographié sur papier dans le solvant K. La révélation par le nitrate d'argent alcalin indique la présence de thréïtol (R_f = 0,50), de glycérol (R_f = 0,66) et d'arabinose (R_f = 0,45).

Digestion du mucopeptide par le lysozyme (111)

a. 50 mg de résidu insoluble obtenu par oxydation periodique des parois sont mis en suspension dans 50 ml d'eau contenant de l'ammoniaque (pH = 6,5), et, additionnés de 0,5 mg de lysozyme (Calbiochem). La solution est homogénéisée à l'aide d'un agitateur téflon, et laissée en contact pendant 24 heures à 37°C sous agitation. Ensuite, le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 10 minutes et le résidu (38 mg) séparé du surnageant par une centrifugation à 12.000g. L'insoluble est de nouveau traité par le lysozyme dans les mêmes conditions et en utilisant toujours 1% d'enzyme par rapport au substrat.

3 mg de résidu insoluble et 3 mg de produit solubilisé sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 6N pendant 18 heures à 100°C, puis chromatographiés, une fois l'acide chassé, sur papier et sur échangeurs d'ions.

b. 35 mg du résidu obtenu par extraction trichloroacétique (voir p. 104) sont traités dans 30 ml d'eau ammoniaquée à pH = 6,5, par le lysozyme (0,350 mg). Après le traitement décrit ci-dessus, le résidu 15 mg est séparé du surnageant par une centrifugation à 12.000g. Une deuxième digestion enzymatique est effectuée sur le résidu, toujours dans les mêmes conditions. Après hydrolyse de l'insoluble et du produit solubilisé, les chromatographies des hydrolysats sur papier et sur échangeurs d'ions à l'aide d'un autoanalyseur Beckman, sont effectuées.

IV. Hydrolyse alcaline des parois (47)

500 mg de parois sont traités par 7 ml de NaOH N à 70°C, sous atmosphère d'azote, pendant 14 heures. Après centrifugation à 12.000g, la solution est acidifiée par l'acide acétique et extraite par l'éther. Le résidu est également extrait par l'éther et le chloroforme. Les phases organiques sont réunies, le solvant évaporé sous vide et le produit, 32 mg méthylé par le diazométhane, est soumis à la spectrométrie de masse (Appareil MS 9 avec introduction directe) et chromatographié en couche mince sur Silicagel G dans le système de solvant R. Il

s'agit d'un mélange de mycolates de méthyle à R_f = 0,27 et R_f = 0,32.

La phase aqueuse est dessalifiée sur une colonne de 4 g de Biogel P10. La colonne utilisée a 15 cm de haut, 2 cm de diamètre. Le volume mort est de 47 ml. Des élutions de 2 ml sont faites par l'eau distillée. Sur chaque fraction un dosage des sucres par l'anthrone et une mesure de la conductivité sont effectués (conductimètre Philips Universel). Les fractions dépourvues de sel et riches en sucres sont réunies, elles constituent les polysaccharides.

La solution aqueuse réduite sous vide à 6 ml, est additionnée de 1 ml d'éthanol. Les premières fractions qui précipitent contiennent du glucose. 1 mg de précipité hydrolysé par l'HCl 2N à 100° pendant 5 heures et chromatographié sur papier dans le solvant B, montre la présence unique de glucose, R_f = 0,34.

Les fractions suivantes précipitées par l'addition de 3 à 4 ml d'éthanol sont composées d'arabinose et de galactose. Il s'agit de l'arabinogalactane (≃ 90 mg).

Etude de l'arabinogalactane

1. Oxydation periodique

5 mg de polysaccharide sont dissous dans 3,5 ml de $NaIO_4$ 0,05M et laissés pendant une semaine à l'obscurité. La solution est ensuite desionisée par l'amberlite MB_3. Après essorage et lavages abondants à l'eau, le filtrat et les eaux de lavage (25 ml) sont lyophilisés. Le produit est ensuite dissous dans une quantité connue d'eau et un dosage des sucres est effectué en prélevant une partie aliquote. Il y a 30% de sucres non oxydés (dosés en arabinose).

L'hydrolyse acide suivie de chromatographie sur papier dans le solvant B montre que le produit contient uniquement de l'arabinose comme sucre réducteur.

2. La réduction du produit oxydé par 10 mg de $NaBH_4$ suivie d'une hydrolyse acide par l'HCl 1,5N 4 heures à 100° et

d'une chromatographie sur papier dans le solvant B indique la présence d'arabinose, de glycérol et de thréitol.

3. Perméthylation de l'arabinogalactane [méthylation selon Hakomori (67)]

50 mg de produit sont dissous dans 5 ml de DMSO (diméthylsulfoxide) et additionnés d'une solution de méthylsulfinylcarbanion (préparé en faisant réagir 10 mg de NaH débarrassé de son huile et 6 ml de DMSO). Le mélange réactionnel est laissé en contact sous agitation magnétique, pendant environ 30 minutes, et un excès d'iodure de méthyle est ajouté. L'agitation continue encore 24 heures puis la solution est diluée avec de l'eau et extraite par le chloroforme. La phase chloroformique est séchée sur SO_4Na_2, le solvant évaporé. Le spectre IR a été enregistré, il ne contient plus de bande OH.

Identification des dérivés méthylés des sucres

- Hydrolyse des produits méthylés: un échantillon de 3 mg du polysaccharide perméthylé est hydrolysé en tube scellé par 0,4 ml d'HCl 1,5N pendant 4 heures à 100°C. L'acide est ensuite éliminé et le résidu est repris par un mélange eau-acétone (1:1). La solution acétonique est chromatographiée sur plaque de Silicagel LS 254 dans le solvant T. La révélation par le phtalate acide d'aniline fait apparaître des taches pourpres et brunes, dont les vitesses de migration sont exprimées en R_G. R_G = 1: vitesse de migration du 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-O-glucose.

	R_G
2,3,5-tri-O-méthyl-arabinofurannose	1,03
2,5-di-O-méthyl-arabinofurannose	0,95
2,3,5-tri-O-méthyl-galactofurannose	0,84
2,3-di-O-méthyl-arabinofurannose	0,74

- Méthanolyse: 5 mg de produit perméthylé sont dissous dans 0,5 ml de méthanol absolu et additionnés de 2 ml de méthanol absolu contenant 4% d'acide chlorhydrique gazeux. La solution est chauffée à reflux pendant 8 heures, puis évaporée à sec. Elle est débarrassée de l'acide chlorhydrique par plusieurs

lavages avec des petites quantités de méthanol et par évaporation sous vide.

- Préparation des acétates d'alditols (68): 10 mg d'arabinogalactane perméthylé sont hydrolysés et réduits dans les conditions habituelles par 6 mg de $NaBH_4$ en alditols; l'acétylation en présence de 3 ml de pyridine anhydre et 6 ml d'anhydride acétique, transforme ces alditols en acétates partiellement méthylés.

Chromatographie en phase gazeuse

Sucres méthylés: ils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne de butanediol succinate à 15% sur célite. Les pics obtenus sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux des témoins authentiques.

Les temps de rétention T_G indiqués ci-dessous sont exprimés par rapport au temps de rétention du 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-α-D-glucoside.

Méthyl glycosides de	Temps de rétention T_G
2,3,5-tri-O-méthyl-D-arabinofurannose*	0,53
2,3-di-O-méthyl-D-arabinofurannose	1,33
2,5-di-O-méthyl-D-arabinofurannose	1,68
3,5-di-O-méthyl-D-arabinofurannose	0,77-2,4
2-mono-méthyl-D-arabinofurannose	4
2,3,5-tri-O-méthyl-D-galactofurannose**	2,9

Alditols partiellement méthylés et acétylés: Ils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne à 3% ECNSS-M sur du chromosorb Q. Les pics obtenus sont aussi identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux des témoins authentiques.

---

* Nous remercions le Prof. E. Percival (Royal Holloway College) pour les échantillons de dérivés méthylés d'arabinose.

** Voir préparation p. 108

V. Extraction par l'acide trichloroacétique

1. Hydrolyse à la température ambiante

A 100 mg de parois sont ajoutés 10 ml d'acide trichloroacétique à 10%. Le mélange réactionnel reste sous agitation magnétique pendant 48 heures à la température ambiante. Après filtration sous vide, la phase aqueuse est épuisée plusieurs fois à l'éther, puis hydrolysée. Le résidu, 30 mg, est séché par traitement à l'acétone, il est analysé après hydrolyse par l'HCl 2N. La révélation par le phtalate acide d'aniline du chromatogramme sur papier, montre la présence d'arabinose et de galactose. Un dosage des sucres effectué sur ce résidu indique qu'il reste encore 10,5% d'oses neutres.

2. Hydrolyse à chaud

100 mg de parois sont mis en suspension dans 10 ml de TCA à 10%, pendant 4 heures à 60°, puis, pendant 20 heures à 37°C sous agitation magnétique. Le résidu obtenu après centrifugation est épuisé quatre fois par 100 ml de $CHCl_3$ bouillant. Après ce traitement les phases chloroformiques sont réunies et concentrées sous vide. Le résidu ne contient plus que des traces de sucres neutres. La solution surnageante après plusieurs extractions à l'éther est lyophilisée.

Analyse de la fraction hydrosoluble

Disaccharide

- La phase aqueuse est chromatographiée sur papier Whatman n°1 dans le solvant C pendant 5 jours avec écoulement du solvant et 3 jours dans le système de solvant B (Fig. 6 dans la partie théorique). Le phtalate acide d'aniline et le nitrate d'argent alcalin permettent de révéler une grande quantité d'arabinose et de galactose libres, ainsi que des di- et trisaccharides de $R_{Tréhalose}$ = 1,0 et 0,82 dans le solvant B.

- Le produit ayant la mobilité du tréhalose témoin est élué du papier. L'éluat est hydrolysé par l'HCl 2N, 4 heures à 100° pour l'identification des sucres. Il contient uniquement

du galactose R_f = 0,16 dans le solvant B. Ce produit est récupéré quantitativement par chromatographie préparative sur papier Whatman n°3 (préalablement lavé à l'eau, dans le solvant B).

- 3 mg de produit sont dissous dans 1 ml d'H_2O. La solution est divisée en plusieurs parties aliquotes. Les opérations suivantes ont été effectuées sur ces échantillons:

le dosage au phénol acide sulfurique des sucres neutres

la réduction par 2 mg de $NaBH_4$, 4 heures à la température ambiante suivie également du dosage des sucres. L'intensité d'absorption diminue de 45%.

- Une partie du produit réduit est neutralisé par le Dowex 50 H^+ et débarrassé du borate par évaporation répétée sous vide avec du méthanol chaud et ensuite hydrolysée par l'HCl 1,5N pendant 4 heures à 100°C.

L'hydrolysat est soumis à une chromatographie analytique dans les solvants A (descendante) et G (ascendante). La double révélation de la feuille permet de mettre en évidence le galactose R_f = 0,16, puis le galactitol.

Hydrolyse acide ménagée

2 mg de digalactoside sont chauffés dans 0,1 ml d'acide sulfurique 0,01N à 85° pendant 90 minutes. L'hydrolysat neutralisé par l'amberlite MB_3, est concentré puis chromatographié sur papier Whatman n°1 dans les solvants A et B. Après révélation, deux taches apparaissent, une au niveau du galactose témoin (R_f = 0,16 dans A) et l'autre ayant la même mobilité que le digalactoside (R_{Gal} = 0,8 dans B).

Dégradation du digalactoside

a. Réduction: 5 mg de digalactoside dissous dans 0,3 ml d'eau sont réduits par 2 mg de $NaBH_4$ pendant 4 heures, à la température ambiante, on ajoute 0,01 ml d'acide acétique, ensuite la solution est neutralisée par le Dowex 50 H^+. Après le traitement habituel, le produit de réduction est chromatographié sur papier dans les solvants B et L. Aucune tache n'est révélée par le phtalate acide d'aniline, par contre, le nitrate

d'argent alcalin donne un spot de R_G = 0,89 et 0,33 dans les solvants respectifs.

b. Oxydation sélective du galactobiitol: 3 mg de galactobiitol sont oxydés par 0,55 ml de $NaIO_4$ 0,1M pendant 4 minutes à l'obscurité et à la température ambiante (20°C). Le mélange réactionnel est neutralisé par l'amberlite MB_3 essoré et concentré. Le produit d'oxydation est réduit dans les conditions décrites précédemment, puis hydrolysé par l'HCl 1,5N pendant 4 heures à 100°C. Le produit hydrolysé est chromatographié dans les solvants A et B. Les révélations faites d'une part par le phtalate acide d'aniline, d'autre part par le nitrate d'argent alcalin ou l'acide periodique benzidine montrent trois spots correspondant à l'arabinose (R_f = 0,4 dans B, et 0,24 dans A), à l'éthylène glycol (R_f = 0,72 dans B et 0,63 dans A) et au glycérol (R_f = 0,55 dans B et 0,50 dans A).

Perméthylation

4 mg de digalactoside sont méthylés selon la méthode d'Hakomori (67) déjà décrite. Les produits obtenus après hydrolyse par l'HCl 1,5N à 100° pendant 4 heures, sont examinés par chromatographie en couche mince de Silicagel G, dans le solvant T. Après révélation par le phtalate d'aniline, trois spots apparaissent au niveau des dérivés méthylés suivants:

2,3,5,6-tétra-O-méthylgalactofurannose*	R_{Glu} = 1,01
2,3,5-tri-O-méthylgalactofurannose*	R_{Glu} = 0,86
2,3,4-tri-O-méthylgalactopyrannose	R_{Glu} = 0,52

Après méthanolyse du disaccharide perméthylé (reflux avec le méthanol à 4% d'HCl pendant 8 heures), les dérivés sont examinés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de butanediol succinate à 15% sur célite. Ils figurent dans le tableau XVI suivant:

2,3,5,6-tétra-O-méthylgalactofurannoside	R_T = 1,1
2,3,5-tri-O-méthylgalactofurannoside	R_T = 2,8
2,3,4-tri-O-méthylgalactopyrannoside	R_T = 4,5

* Voir préparations p. 108

Acétylation

0,5 mg de digalactoside sont dissous dans 0,3 ml de pyridine anhydre et additionnés de 0,2 ml d'anhydride acétique. Le mélange réactionnel est laissé 48 heures à la température ambiante. Après acidification par l'acide sulfurique 1N et extraction par le chloroforme, 4,5 mg de produit acétylé sont isolés.

Les spectres de masse des disaccharides peracétylés ont été enregistrés, la température de la source d'ions étant comprise entre 220 et 240°C (voir p. 37 partie théorique).

Pertriméthylsilylation

0,5 mg de disaccharide sont dissous dans 1 ml de pyridine. Consécutivement 0,2 ml d'hexaméthyldisilazane (HMDS) et 0,1 ml de triméthylchlorosilane sont ajoutés. Après une heure de contact à la température ambiante, 2 ml d'hexane et 2 ml d'eau sont additionnés au mélange. Les deux phases sont agitées très vigoureusement, et la phase organique recueillie est lavée par l'eau et séchée sur Na_2SO_4 puis évaporée à sec. Le résidu est dissous dans 1 ml d'hexane. Le disaccharide réducteur est anomerisé dans l'eau (48 heures à la température ambiante). 10 µl de cette solution sont utilisés pour le spectre de masse.

Les spectres de masse des dérivés triméthylsilylés sont enregistrés aux environs de 100-120°C, avec un spectromètre MS 9 (voir p. 39, 41).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire pour les dérivés triméthylsilylés, ont été effectués avec l'appareil Varian MA 100 F T (techniques des transformées de Fourier)*.

Synthèse

1. β-D-galactofurannoside d'éthyle (I) (92)

Un mélange de 11,4 g de dithioacétal du galactose (1 mole) de 21,8 g de chlorure mercurique (2 moles) et un excès d'oxyde jaune de mercure (17 g) est maintenu en contact à 20°C sous agi-

---

* Ces mesures ont été effectuées en collaboration avec les Dr J.F.G. Vliegenthart et J.P. Kamerling.

tation, pendant 2 heures, dans 200 ml d'éthanol anhydre.

Le produit réactionnel est filtré et 5 ml de pyridine sont ajoutés au filtrat. Le complexe pyridine-chlorure mercurique précipite presque immédiatement. Après une nuit en contact à 0°, la solution est filtrée, le filtrat neutralisé par quelques gouttes de soude aqueuse diluée,puis évaporé jusqu'à siccité, le sirop obtenu cristallise après quelques heures. Le dérivé furannosique, 5,7 g est purifié par plusieurs cristallisations dans l'éthanol, puis dans l'acétate d'éthyle, il se présente sous forme d'aiguilles blanches. F = 85-86°C.

2. 2,3,5,6-tétra-O-benzyl-D-galactofurannoside d'éthyle.II (93).

0,7 g de β-D-galactofurannoside d'éthyle sont ajoutés à 0,340 g de NaH (en dispersion dans l'huile) dans 20 ml de DMSO, sous atmosphère d'azote. 4,2 ml de bromure de benzyle sont alors versés goutte à goutte à l'aide d'une microburette. Le mélange est maintenu pendant 24 heures à la température ambiante, sous agitation magnétique (la réaction est suivie par chromatographie en couche mince), puis jeté sur glace pilée et extrait plusieurs fois par 50 ml d'éther. La phase éthérée est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée sur papier filtre et évaporée à sec. 2,56 g de sirop sont obtenus.

1 g de produit benzylé est purifié sur une colonne de gel de silice (75 g). Les élutions de 4 ml s'effectuent à l'aide d'un mélange éther de pétrole-éther (2:1). Les fractions pures sont réunies (300 mg), et le produit (II) est distillé sous vide puis donné à l'analyse élémentaire.

Calculé pour $C_{36}H_{30}O_6$ C = 76,03 H = 7,09
Trouvé 76,31 7,02

RMN (60 MHz) solvant: $CDCl_3$: 1,2 ppm t. (3 H, CH_2-$\underline{CH_3}$)
7,3 ppm massif (20 H, aromatique)
5,1 ppm d (1 H; H-1)

3. 2,3,5,6-tétra-O-benzyl-D-galactofurannose III

A 200 mg de dérivé II dissous dans 7 ml de dioxanne, 3 ml d'acide chlorhydrique 3N sont ajoutés. La solution est mainte-

nue à ébullition pendant une nuit, puis neutralisée par la soude aqueuse. Le solvant est chassé sous vide et le résidu extrait par le chlorure de méthylène. L'extrait est lavé plusieurs fois à l'eau distillée, puis séché sur SO_4Na_2. Après évaporation du solvant, un sirop jaune pâle (III) est obtenu (110 mg). Ce produit chromatographié en couche mince donne une révélation positive au phtalate acide d'aniline.

4. 1-O-p-nitrobenzoyl-2,3,5,6-tétra-O-benzyl-D-galactofurannose IV.

Un sirop contenant 50 mg de III est dissous dans 2 ml de pyridine, on y ajoute 50 mg de chlorure de para-nitrobenzoyle. Après 22 heures de contact à la température de 10-15°C, la solution brune est versée sur un mélange glace-solution saturée de bicarbonate de soude, et on agite pendant une heure. Le produit est ensuite extrait au chloroforme et la phase chloroformique est lavée par une solution de bicarbonate de Na, et par l'eau, puis séchée sur SO_4Na_2. Après évaporation du solvant, 12 mg de sirop jaune clair sont obtenus.

5. 1-O-acétyl-2,3,5,6-tétra-O-benzyl-D-galactofurannose V

Le dérivé III (50 mg) est acétylé dans les conditions déjà décrites plus haut, pour donner le dérivé V.

Préparation du 2,3,5,6-tétra-O-méthyl-galactofurannoside de méthyle

500 mg de dérivé I sont perméthylés selon la méthode d'Hakomori (67) (voir p.101) pendant 48 heures pour donner le 2,3,5,6-tétra-O-méthylgalactofurannoside utilisé comme témoin en chromatographie en phase gazeuse.

Préparation du 2,3,5-tri-O-méthylgalactofurannoside de méthyle

a. 6-O-trityl-D-galactofurannoside d'éthyle (A) (94)

200 mg de dérivé I sont dissous dans 6,5 ml de pyridine anhydre et additionnés de 440 mg de chlorure de triphénylméthane. Après 48 heures d'agitation à la température ambiante, le mélan-

ge réactionnel est jeté sur glace pilée. La solution trouble est extraite plusieurs fois par le chloroforme. Les différentes phases organiques sont rassemblées, lavées par l'acide chlorhydrique 2N, puis par l'eau distillée, elles sont enfin séchées sur SO_4Na_2. Le solvant est chassé sous vide et 515 mg de sirop brun sont isolés.

Purification: 515 mg de dérivé A sont purifiés par chromatographie sur acide silicique (Mallinkrodt):célite (2:1), la colonne utilisée a 40 cm de haut et 1,5 cm de diamètre. Les élutions par fractions de 1,5 ml s'effectuent au moyen du mélange $CHCl_3$:acétone (4:1). La chromatographie en couche mince de silicagel des fractions 15 à 25 et la révélation par l'acide sulfurique à 50% permettent de déceler une seule tache. 286 mg de 6-O-trityl-β-D-galactofurannoside d'éthyle pur sont isolés.

b. 2,3,5-tri-O-méthyl-6-O-trityl-β-D-galactofurannoside d'éthyle (B)

286 mg de la substance (A) précédemment purifiée sont perméthylés selon la méthode d'Hakomori (67). Le produit de la réaction, 225 mg, est purifié par filtration sur une colonne de 4 g de silicagel-célite (2:1). Les élutions de 2 ml sont effectuées par le mélange éther de pétrole-acétate d'éthyle (75:25). Les fractions de 42 à 50 analysées en couche mince montrent la présence d'une seule tache. Elles sont réunies, 99 mg de produit visqueux et incolore sont obtenus.

c. 2,3,5-tri-O-méthyl-β-D-galactofurannose (C)

Une solution de 99 mg du composé B dans 6 ml d'acide acétique glacial est refroidie à 0°. On ajoute alors sous agitation, 1,2 ml d'acide bromhydrique à 35° dans l'acide acétique. Il y a apparition d'un précipité blanc de bromure de triphényl carbinol. Le mélange réactionnel est filtré sur verre fritté et le filtrat est versé sur l'eau glacée saturée en bicarbonate de Na. Après extraction par le $CHCl_3$, la phase organique est séchée sur SO_4Na_2, et concentrée sous vide, elle fournit 70 mg de produit, qui sont, par la suite, hydrolysés par HCl 3N dans le dioxanne pour donner le composé C.

d. 2,3,5-tri-O-méthyl-β-D-galactofurannoside de méthyle

50 mg de dérivé C sont méthanolysés selon la méthode déjà décrite plus haut (p.101).Après la réaction, la substance est filtrée sur 2 g d'acide silicique-célite (2:1), avec élution par le chloroforme contenant des quantités croissantes de méthanol. Les fractions 37 à 60 présentant une pureté chromatographique sont réunies ($CHCl_3$ + 2% MeOH). Cette substance est analysée par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil Intersmat (par ionisation de flamme), 2 pics sont observés dont les temps de rétention sont calculés par rapport à celui du tétra-O-méthylglucoside T_G = 2,8 et 3,7.

Trisaccharide

Le produit d'hydrolyse partielle des parois ayant un R_f = 0,82 dans le solvant B est recueilli par chromatographie sur papier Whatman n°3 préalablement lavé à l'eau.

1 mg de cette substance est hydrolysé par 1,5 ml d'HCl 1,5N à 100°C pendant 5 heures, puis chromatographié dans le solvant B, 3 spots sont révélés par le phtalate d'aniline au niveau de l'arabinose (R_f = 0,4), du galactose (R_f = 0,16) et du glucose (R_f = 0,29).

Cette substance, 10 mg,est acétylée selon la méthode décrite précédemment (p.106) Le produit acétylé est chromatographié en couche mince dans le solvant S, en présence d'arabinose, de tréhalose et raffinose peracétylés (voir Fig.16 dans la partie théorique).

Après révélation spécifique, deux taches de R_f = 0,76 et 0,58 apparaissent. Elles se situent au niveau du tréhalose et du raffinose peracétylés témoins.

Les substances de R_f = 0,76 et 0,58 sont récupérées par chromatographie préparative en couche mince de silicagel G dans le solvant S.

La fraction a (R_f = 0,76; 2,5 mg) est soumise à la spectrométrie de masse. Le spectre de masse est obtenu à la température de la source d'ions entre 220 et 250°.

La fraction b (R_f = 0,58; 3 mg) est hydrolysée par 1 ml d'HCl 1,5N à 100° pendant 18 heures. Sa chromatographie sur papier Whatman n°1 dans le solvant B, suivie de la révélation au phtalate acide d'aniline montre trois spots au niveau du galactose, de l'arabinose et du glucose.

Analyse de la fraction chloroformesoluble

Glycolipides I et II

Le produit soluble dans le chloroforme (80 mg) F = 43-45° est méthylé par le diazométhane en solution dans l'éther, puis chromatographié sur 3 g d'acide silicique:célite (2:1).

L'élution est faite par le chloroforme pur et le chloroforme contenant des quantités croissantes de méthanol. Les fractions recueillies sont de 2 ml.

Glycolipide I

a. 1 mg de la fraction éluée avec du chloroforme à 2% de méthanol, est hydrolysée par l'HCl 1,5N à 100° pendant 18 heures. L'hydrolysat est extrait par l'éther, les phases aqueuse et éthérée sont concentrées.

La fraction hydrosoluble est chromatographiée sur papier Whatman n°1 dans le solvant B. Une seule tache est observée dont le R_f est identique à celui de l'arabinose.

b. La phase éthérée est méthylée par le diazométhane pendant 30 minutes, à la température ambiante et chromatographiée sur couche mince de silicagel G dans le solvant R. Trois spots sont identifiés, correspondant aux mycolates de méthyle: R_f = 0,29; 0,38 et 0,45. Son spectre est enregistré à la température de 280°C.

Un échantillon de ce glycolipide, 10 mg, est soumis à l'hydrolyse alcaline par NaOH 0,5N à 37°C pendant 2 heures. Après neutralisation par le Dowex 50 H^+ et traitement habituel, un dosage des sucres est effectué sur une partie aliquote de la phase hydrosoluble. Le produit analysé contient 10% d'oses neutres calculés en arabinose.

L'examen chromatographique permet d'identifier à de l'arabinose, une tache de R_f = 0,24 (dans le solvant A).

Glycolipide II

La fraction II (2 mg) (éluée par du $CHCl_3$ à 5% de méthanol est hydrolysée par l'HCl 1,5N pendant une nuit à 100°C. La chromatographie de la phase hydrosoluble sur papier Whatman n°1 dans les systèmes de solvants A et B montre un spot correspondant à l'arabinose.

La phase éthérée méthylée par le diazométhane, puis chromatographiée en couche mince de silicagel G dans le solvant R présente après révélation à la rhodamine B trois taches aux R_f = 0,29; 0,38 et 0,45 aux niveaux d'un mélange d'acides mycoliques authentiques.

5 mg de cette fraction II sont soumis à une hydrolyse alcaline ménagée dans les mêmes conditions que pour le produit décrit précédemment. La partie soluble dans l'eau est chromatographiée analytiquement sur papier Whatman n°1 dans le solvant C, une substance de $R_{Tréhalose}$ = 0,97 est mise en évidence. Elle est révélée à la fois par le réactif de Partridge et par le nitrate d'argent alcalin. Son hydrolyse acide fournit uniquement de l'arabinose.

Lipides liés

Les cellules bactériennes sont soumises à une délipidation selon le schéma d'Anderson et sont ensuite extraites deux fois par le $CHCl_3$-MeOH (2:1)

1 g de bactéries délipidées est hydrolysé dans 25 ml d'acide chlorhydrique 0,1N à 37° pendant 48 heures. Le résidu bactérien est ensuite extrait par le $CHCl_3$ et l'éther.

Les extraits rassemblés sont évaporés à sec et le résidu est examiné par chromatographie en couche mince dans les solvants X et U. La révélation au moyen de l'acide sulfurique à 50% indique surtout une tache de R_f = 0,36 correspondant au mycolate d'arabinose témoin.

Le produit est hydrolysé par l'HCl 2N à 100° pendant 16 heures et extrait par l'éther. La phase éthérée de cet hydroly-

sat, estérifiée par le diazométhane, est chromatographiée en couche mince, elle montre la présence d'esters d'acides mycoliques. R_f = 0,27 et 0,32 dans le solvant R.

La phase aqueuse chromatographiée sur papier dans le solvant B indique un spot principal de R_f = 0,4 au niveau de l'arabinose témoin, un autre à l'état de trace, au niveau du galactose, de R_f = 0,23.

Glucane

Isolement du glucane

L'insoluble obtenu par hydrolyse acide ménagée par l'acide trichloroacétique, 100 mg, est mis en suspension dans 20 ml de soude aqueuse 0,1N, pendant deux heures, sous agitation constante. Après centrifugation à 8.000 t/min., le surnageant basique est séparé du résidu, puis neutralisé par l'acide acétique dilué. La solution neutre est dialysée contre l'eau pendant 24 heures, la fraction non dialysable est réduite à un volume d'environ 5 ml, puis on ajoute goutte à goutte de l'éthanol (2 ml), il se forme un précipité, 12 mg, qui est séparé de la solution surnageante par centrifugation.

1 mg de ce précipité est hydrolysé par 0,5 ml de HCl 2N 4 heures à 100°C, puis examiné par chromatographie sur papier dans le solvant B, il contient surtout du glucose (R_f = 0,29) et des traces d'arabinose.

Purification

5 mg de précipité sont chromatographiés sur une colonne de Sephadex G-25 (grosseur des grains: 20-80 µ).
Caractéristiques de la colonne: diamètre intérieur: 1,3 cm ; hauteur de gel: 37 cm ; volume mort: 23 ml.

Temps de gonflage du Sephadex G-25: 3 heures à la température ambiante.

Les élutions sont faites par de l'eau distillée, les fractions recueillies sont de 1 ml, un collecteur de fractions

Seive est utilisé et la chromatographie est suivie par dosages des sucres neutres tous les cinq tubes. La courbe d'élution est illustrée par la Fig.17 (voir partie théorique). Deux fractions sont obtenues.

Tableau XVII

	Volumes d'élution	Poids	Constituants trouvés
A	23-78 cc	3 mg	glucose
B	79-138 cc	1 mg	glucose + arabinose

Oxydation periodique de la fraction A

3 mg de la fraction A sont oxydés par 2 ml de $NaIO_4$ 0,05M pendant 72 heures. Après traitement habituel et chromatographie sur papier dans le solvant B, la présence du glucose n'est pas décelée.

Perméthylation

12 mg de la fraction A (provenant de chromatographies répétées, sur gel) sont méthylés (104).

La substance est dissoute dans 0,1 ml d'eau et additionnée de 0,2 ml de soude aqueuse à 30%. Après deux heures, une pastille de soude et 0,6 ml de sulfate de méthyle sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité pendant 20 heures à la température ambiante et extrait au chloroforme. La phase chloroformique est séchée dans un dessicateur avec P_2O_5 pendant 24 heures, puis le produit est méthylé de nouveau selon la méthode d'Hakomori (dans les conditions décrites p. 101).

Identification des dérivés méthylés

8 mg de polysaccharide perméthylé (le spectre IR ne présente plus de bande OH) sont hydrolysés par 0,5 ml d'HCl 1,5N pendant 4 heures à 100°, en tube scellé. L'acide est ensuite éliminé et l'hydrolysat est chromatographié sur papier Whatman n°1 dans les systèmes de solvants C (descendante) et I (ascendante), en présence de témoins authentiques.

Les chromatogrammes sont révélés par:

a. le trichloroacétate de N,N'-diméthyl-aniline

b. le phtalate

c. le chlorure de triphényltétrazolium

qui permettent d'identifier le: 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-glucose
2,3,6-tri-O-méthyl-glucose
2,3-di-O-méthyl-glucose

Une faible quantité d'un tri-O-méthyl-glucose est décelée, il s'agit du 2,3,4-tri-O-méthyl-glucose.

Autres méthodes de préparation

Méthode de Chargaff (106)

20 g de bacilles dans 140 ml d'eau, auxquels on ajoute 140 ml de TCA 0,2N, sont agités mécaniquement pendant 17 heures à 0°C.

Le résidu bactérien est obtenu par centrifugation, et lavé avec le TCA 0,1N. Les surnageants sont réunis, puis la solution est dialysée contre l'eau pendant 64 heures. Ensuite, la solution est réduite à un faible volume, puis soumise à une centrifugation différentielle. Le sédiment obtenu se présente sous forme de produit blanc (102 mg). Un échantillon de ce produit (1 mg) est hydrolysé par l'HCl 2N pendant 4 heures à 100°C. L'analyse chromatographique de cet hydrolysat dans le solvant B indique la présence de glucose et d'arabinose.

Méthode de Kent et Stacey (107)

21 g de bacilles sont extraits avec une solution NaOH 1N, 200 ml, pendant 24 heures à 90°C. Après centrifugation, le résidu insoluble est enlevé, et la liqueur est acidifiée avec l'acide acétique. Par addition de 4 volumes d'EtOH, un précipité de sucres est obtenu. Ce précipité est redissous dans un peu d'acide acétique N/20 et dialysé pendant 48 heures contre l'eau. Après centrifugation, le polysaccharide, 1,5 g, est reprécipité avec un excès d'éthanol. Son hydrolyse par l'acide 2N pendant

4 heures à 100°C, suivie d'une chromatographie sur papier, indique la présence de glucose et d'arabinose.

VI. Acétolyse des parois

500 mg de parois sont traités à 4° par le mélange d'acide acétique glacial, d'anhydride acétique, d'acide sulfurique 10 vol.:10 vol.:1 vol., au total 105 ml. Le produit reste insoluble dans le milieu réactionnel. Il est alors maintenu en contact à 37°C pendant 2 heures. Une partie importante est solubilisée dans ces conditions.

Après centrifugation, la solution surnageante est neutralisée par la pyridine, puis jetée sur glace pilée. Les acétates d'oligosaccharides et d'oses précipitent. Le précipité est épuisé par le chloroforme, la phase chloroformique est séchée sur SO_4Na_2, puis amenée à sec. 350 mg de produit acétylé sont recueillis.

Lors de l'extraction par le chloroforme, il se forme une phase intermédiaire, cette dernière est séchée dans un dessicateur avec P_2O_5, un échantillon de 1 mg est hydrolysé par HCl 6N et HCl 2N, chromatographié sur papier Whatman n°1 dans le solvant A.

La révélation par la ninhydrine montre la présence d'acides aminés: ala, glut, phénylalanine, valine, leucine, thréonine, serine, glucosamine; le phtalate acide d'aniline décèle le glucose comme sucre réducteur.

Un échantillon de la fraction chloroformique chromatographié sur couche mince de Silicagel G dans le solvant S, en présence d'oses acétylés, montre l'existence de plusieurs constituants (voir Fig. 21).

Essais de séparation

Ces produits sont séparés soit par chromatographies préparatives sur couche mince, soit par chromatographie sur colonne.

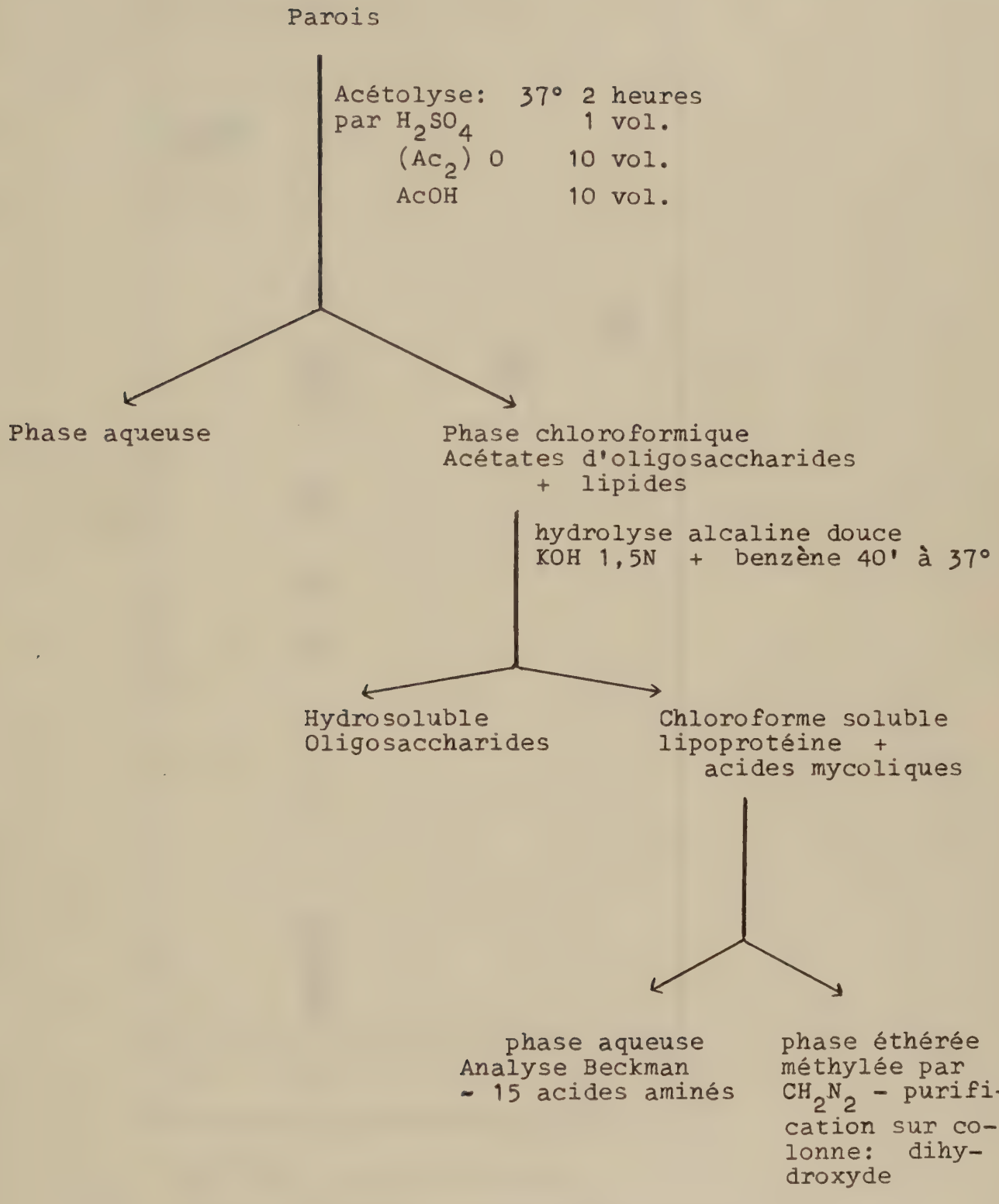

Parois
Acétolyse: 37° 2 heures
par H_2SO_4 1 vol.
(Ac_2) O 10 vol.
AcOH 10 vol.
Phase aqueuse
Phase chloroformique
Acétates d'oligosaccharides
+ lipides
hydrolyse alcaline douce
KOH 1,5N + benzène 40' à 37°
Hydrosoluble
Oligosaccharides
Chloroforme soluble
lipoprotéine +
acides mycoliques
phase aqueuse
Analyse Beckman
- 15 acides aminés
phase éthérée
méthylée par
CH_2N_2 - purifi-
cation sur co-
lonne: dihy-
droxyde

Schéma 3

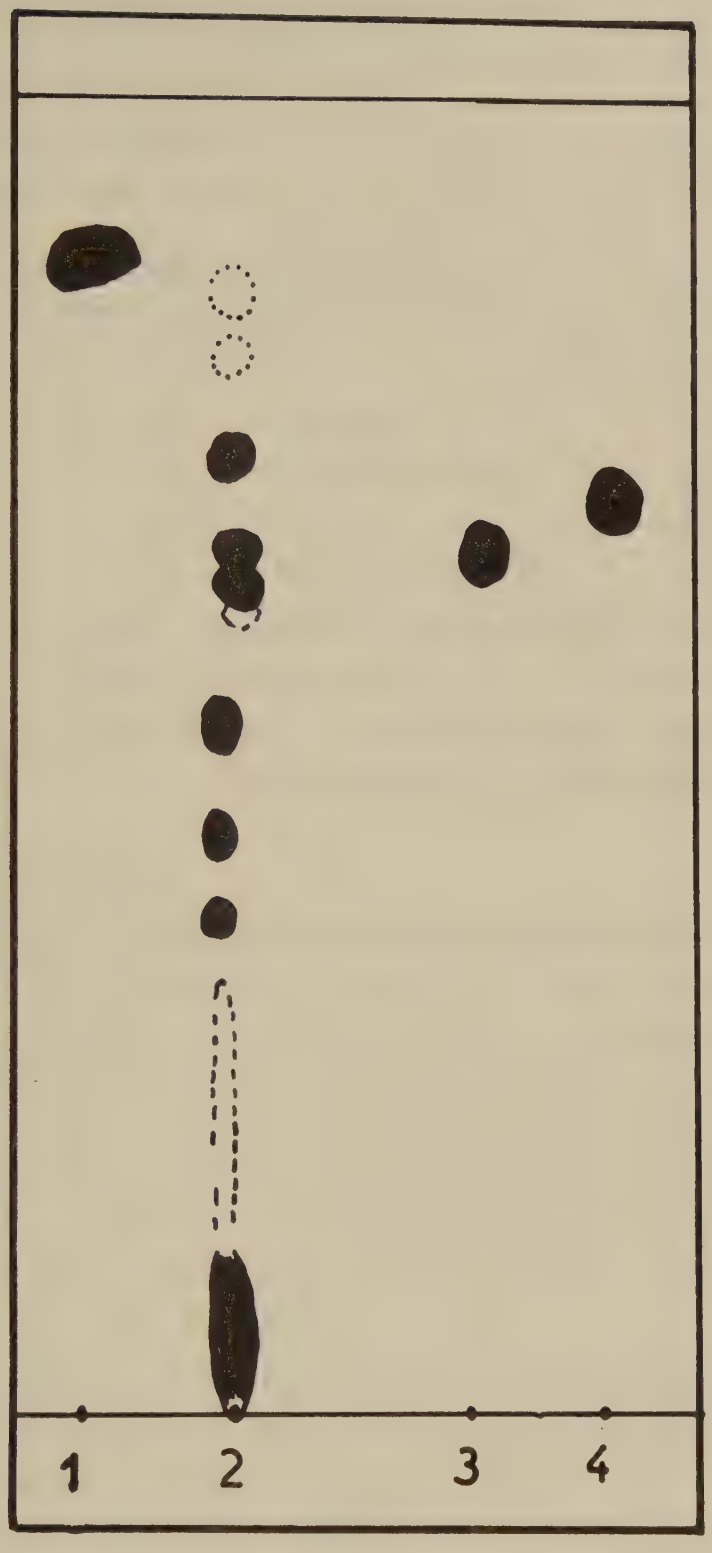


Fig. 21: Acétolyse des parois

1, 3, 4 : arabinose, raffinose, tréhalose peracétylés
2 : phase chloroformique.

Chromatographie sur couche mince: les couches minces de Silicagel G sont utilisées. La migration dans le solvant S est suivie par révélation au moyen de l'eau distillée. Ceci permet de mettre en évidence plusieurs plages opaques. Après séchage des plaques, les bandes sont éluées par le $CHCl_3$.

Chromatographie sur colonne: 50 mg de chloroforme soluble sont chromatographiés sur une colonne de 1,2 g de trisilicate de magnésium:célite (2:1). Les élutions sont de 1 ml.

Fractions 1-8 :	benzène	9,7 mg
8-13:	benzène-éther 10%	13 mg
14-26:	$CHCl_3$	10 mg
27-	$CHCl_3$-MeOH 10%	6 mg

Les produits récupérés par les deux méthodes sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 2N, et chromatographiés sur papier dans le solvant B. Tous contiennent les taches correspondant au glucose, à l'arabinose et au galactose.

Lipoprotéine

300 mg de chloroformesoluble sont soumis à une hydrolyse alcaline à 37° pendant 40 minutes. Après traitement habituel, le mélange est extrait par le $CHCl_3$. La phase organique séchée et évaporée à sec fournit 60 mg de produit (lipoprotéine + acide mycolique), qui est méthylé par le CH_2N_2 (30 minutes à la température ambiante). Il est ensuite chromatographié sur couche mince dans le solvant R. La révélation par la rhodamine permet de visualiser trois taches à R_f = 0; 0,27; 0,32 (identiques à celles de mycolates de CH_3).

La substance de R_f = 0 est purifiée par chromatographie préparative dans les mêmes conditions, et analysée ensuite par chromatographie en couche mince, dans le solvant X. Une seule tache est observée par révélation à l'acide sulfurique de R_f = 0,13.

Hydrolyse acide: 10 mg de lipoprotéine sont hydrolysés en tube scellé par 0,5 ml de HCl 6N, à 105°, pendant une nuit. L'hydrolysat est extrait par l'éther, l'acide éliminé par plu-

sieurs lavages à l'eau, et le résidu examiné à l'aide d'un auto-analyseur d'acides aminés (voir résultats dans la partie théorique).

L'éthérosoluble (5 mg) est estérifié par le diazométhane en solution dans l'éther, pendant une demi-heure, puis purifié par chromatographie sur colonne de 320 mg de trisilicate de Mg:célite. La colonne a un diamètre intérieur de 6 mm et une hauteur de 50 cm. Les élutions de 0,5 ml sont effectuées par: le benzène, benzène-éther (1:1), $CHCl_3$MeOH 5%, $CHCl_3$MeOH (1:1).

Les fractions éluées par le C_6H_6 (1 mg) et le benzène-éther (1:1) (environ 3 mg) sont chromatographiées en couche mince dans le solvant X, et soumises à la spectrométrie de masse (voir l'interprétation dans la partie théorique).

CHAPITRE III

RECHERCHE DE L'ACIDE POLYGLUTAMIQUE

500 mg de parois préalablement digérées par la pronase sont mis en suspension dans 150 ml de potasse aqueuse 0,5N. Le mélange réactionnel est maintenu en contact pendant 8 heures à la température de 70°C, sous agitation magnétique.

Après extraction par l'éther, le mélange réactionnel est centrifugé à faible vitesse 1000 t/min., pendant 20 minutes. La solution surnageante est ainsi séparée du culot (≃ 9 mg). Ce dernier est lavé par l'eau distillée jusqu'à neutralité. 3 mg de ce résidu sont hydrolysés par 1 ml d'acide chlorhydrique 6N à 105° pendant 18 heures. L'acide est chassé et l'hydrolysat est repris par de l'eau. Une partie est chromatographiée sur échangeurs d'ions à l'aide d'un autoanalyseur Unichrom. Les pics correspondants aux acides aminés suivants sont identifiés: aspartique, alanine, thréonine, glycocolle, en faible quantité, seul le pic d'acide glutamique est important.

Le reste de l'hydrolysat est soumis à l'action de la décarboxylase d'acide L-glutamique dans un tampon acétate de sodium 0,05M à pH = 5,5 à 37°C pendant 20 minutes. Après incubation, le produit est de nouveau examiné sur échangeurs d'ions à l'aide de l'autoanalyseur, et en couche mince de Silicagel G dans le solvant Y (R_f = 0,19).

Par ailleurs, l'hydrolyse de 1 mg du résidu, par l'HCl 2N (0,5 ml) pendant 4 heures à 100°C, suivie d'une chromatographie sur papier dans le solvant C et de révélation spécifique indique la présence de glucose, accompagné de faibles quantités de galactose et d'arabinose.

La solution surnageante est à son tour centrifugée à grande vitesse (15.000 t/min.). Les parois sédimentent, elles sont lavées abondamment à l'eau distillée.

1 mg de parois est hydrolysé par 0,5 ml d'HCl 6N en tube scellé, pendant 18 heures à 100°C. L'acide est chassé, l'hydro-

lysat repris par de l'eau est chromatographié sur papier dans le solvant A. La révélation par la ninhydrine permet d'identifier les constituants aminés des parois.

CHAPITRE IV

PEPTIDOLIPIDES

Lipide à ornithine

20 g de mycobactéries (poids sec) sont traités trois fois par 500 ml d'alcool-éther pendant 24 heures, à la température ambiante. L'extrait éthéroalcoolique contenant les lipides est concentré jusqu'à siccité, puis repris par un mélange d'eau et d'éther (1v/1v). Lors de l'extraction, il se forme une phase intermédiaire.

Cette dernière est séchée dans un dessicateur sous P_2O_5.

Un échantillon de cette substance (200 µg) solubilisé dans le chloroforme est chromatographié en couche mince de Silicagel G dans le système de solvants U.

La révélation par l'iode montre la présence de plusieurs taches qui se confondent en une traînée. On ne décèle aucune tache par le réactif de Dittmer. La ninhydrine révèle un produit de R_f = 0,2. Il est récupéré par chromatographies préparatives.

3 mg de cette substance sont soumis à une hydrolyse acide totale (6N HCl à 100° pendant 18 heures, en tube scellé). La chromatographie de l'hydrolysat sur papier dans le solvant Y donne deux taches révélées par la ninhydrine, correspondant: l'une importante, à l'ornithine (R_f = 0,11), l'autre faible, à la lysine.

La phase éthérosoluble de l'hydrolysat après méthylation par le diazométhane est chromatographiée en couche mince dans le solvant R. La révélation est faite par pulvérisation de rhodamine B. On voit apparaître plusieurs taches de R_f = 0,27, 0,32, 0,45, identiques à ceux du mycolate de méthyle, et de R_f = 0,9 correspondant aux esters méthyliques des acides en C_{16} et C_{20}.

Le mycoside

Culture, extraction, purification

La souche de Mycobacterium Kansasii n°4, souche atypique a été cultivée sur milieu de Sauton à 37° pendant 3 semaines.

Asparagine	4 g	
Acide citrique	2	
K_2HPO_4	0,5	
$MgPO_4$	0,5	
Citrate de fer	0,05	pH = 7,2-7,5
$ZnSO_4$	0,001	
$CaCl_2$	0,0005	
$CuSO_4$	0,0001	
Glycérol	48 ml	

Les bacilles récoltés, 1,2 kg (en poids humide) sont ensuite lavés abondamment à l'eau distillée et essorés. Les lipides sont extraits selon le procédé mis au point par Anderson d'abord par le mélange alcool-éther (1v/1v), 3 extractions à 48 heures d'intervalle (6 litres), ensuite par le chloroforme 3 fois 2 litres (13l).

Cet extrait chloroformique, 36,2 g, est filtré sur millipore, puis évaporé à siccité.

500 mg de cette substance brute sont chromatographiés sur 17,5 g d'acide silicique et 7,5 g de célite. Les élutions par le $CHCl_3$ et le $CHCl_3$ contenant des quantités croissantes de méthanol, sont de 5 ml.

Fractions	Solvant	Poids
A	$CHCl_3$ 50 ml	327 mg
B	$CHCl_3$ + 2% MeOH 50 ml	10 mg
C	$CHCl_3$ + 5% MeOH 50 ml	10 mg

Chaque fraction est chromatographiée sur couche mince dans le système de solvants X, en présence d'un témoin de mycoside de Mycobacterium butyricum de R_f = 0,16.

La fraction A, éluée avec le $CHCl_3$ pur, est épuisée plusieurs fois par l'éther à chaud. 39 mg de produit pur insoluble dans l'éther et dans l'eau sont obtenus.

Etude des constituants

Acides gras: Leur poids moléculaire moyen déterminé par titrage à l'aide d'une microburette est de 505.

Acides aminés: Les hydrolyses totales du mycoside sont effectuées en tube scellé à 100° dans l'HCl 6N pendant 24 heures (3 mg dans 0,3 ml de HCl). Après extraction par l'éther des lipides, la partie hydrosoluble donne sur papier Whatman n°1 dans le système de solvants A, des taches correspondant aux acides aminés suivants: Phénylalanine (R_f = 0,58), Alanine (R_f = 0,24), allothreonine (R_f = 0,20), alaninol (R_f = 0,32).

1 mg de mycoside est hydrolysé par HCl 6N pendant 48 heures et soumis à un dosage quantitatif sur un autoanalyseur Beckman [colonne: hauteur de la résine: 60 cm - tampon: pH = 3,20 (0,2N citrate de Na), pH = 4,14 (0,38N citrate de sodium)].

Quatre constituants sont identifiés d'après leur temps de rétention.

Pour différencier l'allothréonine et la thréonine, une chromatographie sur papier dans le solvant N est effectuée. Les R_f respectifs sont de 0,12 et 0,16.

Sucres: Ils sont obtenus par hydrolyse en tube scellé par HCl 2N pendant 16 heures à 105°, 6 mg dans 0,7 ml d'HCl. Ils sont identifiés par chromatographie sur papier, dans les systèmes de solvants A et L, avec des échantillons authentiques, et par spectrométrie de masse. Il s'agit du 6-desoxytalose (R_f = 0,46) dans le solvant A, et d'un di-O-méthylrhamnose (R_f = 0,75) dans le solvant A (le spectre de masse est enregistré avec un appareil MS 9, par introduction directe).

CHAPITRE V

INFLUENCE DE LA D-CYCLOSERINE SUR LA BIOSYNTHESE DES CIRES D

Deux lots de Mycobacterium tuberculosis $H_{37}R_a$ ont été cultivés sur milieu Proskauer et Besk modifié.

Composition du milieu:	Asparagine	5	g %
	Citrate de magnesium	1,5	g
	K_2HPO_4	5	g
pH = 7	Glycérol	20	ml
	Sulfate de potassium	0,5	g

- Le premier lot est cultivé pendant 4 semaines à 37°

- Le deuxième dans les mêmes conditions, mais 10 jours en présence de D-cyclosérine.

1 ml d'une solution de D-cyclosérine (408 mg/100 ml) est ajouté dans chaque flacon contenant 200 ml de milieu. L'antibiotique atteint la concentration finale de $2 10^{-4}$M.

Les cellules du lot témoin et du lot traité par l'antibiotique sont récoltées par centrifugation à 2.000 t/min., lavées abondamment à l'eau distillée puis délipidées selon la méthode d'Anderson, modifiée par Asselineau (131).

Elles sont traitées d'abord par le mélange alcool-éther 1:1 (4 x 2 litres) sous agitation pendant 48 heures à la température ambiante, ensuite 3 fois par 500 ml de $CHCl_3$ pendant la même durée.

I. Les extraits éthéroalcooliques

Ils donnent une fraction qui, par la suite, se sépare en deux phases: éthéro et hydrosoluble. Après concentration, l'éthérosoluble est chauffé à reflux dans 250 ml d'acétone, filtré à chaud et le résidu insoluble est de nouveau traité de la même manière. Après filtration à chaud, une fraction inso-

luble est obtenue.

Hydrolyses acides

1 à 2 mg de chaque fraction acétonoinsoluble sont hydrolysés en tube scellé par l'acide chlorhydrique 1,5N (0,5 ml) à 100° pendant 16 heures.

Les hydrolysats concentrés sous vide, puis lavés plusieurs fois à l'eau distillée, sont chromatographiés sur papier Whatman n°1 dans le solvant A. La révélation par le nitrate d'argent alcalin montre la présence de mannose (R_f = 0,21), d'inositol (R_f = 0,09) et des traces de glucose (R_f = 0,18).

2 mg de chaque fraction acétonoinsoluble sont hydrolysés en tube scellé par l'acide chlorhydrique 6N (0,5 ml) à 100° pendant 18 heures.

Les hydrolysats sont amenés à sec et soumis au traitement habituel et enfin, chromatographiés sur échangeurs d'ions à l'aide d'un autoanalyseur Unichrom. Les acides aminés se trouvant dans le spectre figurent dans le tableau XVIII.

II. Les extraits chloroformiques

Ils sont également séparés en fractions acétonoinsolubles et acétonosolubles, comme ci-dessus.

Les fractions insolubles ou Cires D (des échantillons de 2 mg) sont hydrolysées par l'HCl 2N et par l'HCl 6N pendant 18 heures à 100°.

La chromatographie sur papier Whatman n°1 des hydrolysats, dans le solvant A, en vue de l'examen des sucres, indique après révélation par le phtalate acide d'aniline, la présence d'arabinose (R_f = 0,23), de galactose (R_f = 0,16), de mannose (faible quantité) (R_f = 0,20).

Les acides et sucres aminés identifiés par chromatographie sur échangeurs d'ions à l'aide d'un autoanalyseur sont: ala; glut, asp, glyc, muramique, glucos., et, en faibles quantités: val, leu, phe.

Hydrolyse alcaline

Les Cires D (100 mg) sont mises en suspension dans 10 ml de benzène, et 3 ml de potasse méthanolique 1N, à reflux, pendant 2 heures. Le mélange est neutralisé par le Dowex 50 H^+, puis extrait par l'éther. Les phases éthérées du lot témoin et du lot traité contiennent environ 20% d'acides gras. Les phases éthérées méthylées, chromatographiées en couche mince, dans le solvant R, en présence d'esters mycoliques, montrent des spots au niveau des témoins et deux spots de R_f = 0,84 et 0,7.

Les spectres de masse ont été enregistrés à la température de 180° et de 250° (voir partie théorique).

Des échantillons de 0,5 mg de Cires D sont chromatographiés analytiquement dans le solvant U. Les révélations par la ninhydrine et le réactif de Dittmer, indiquent la présence de phospholipides avec un acide aminé (R_f du produit = 0,6).

Le produit de R_f = 0,6 (12 mg) est récupéré par chromatographie préparative en couche mince dans le solvant U . Son hydrolyse acide (HCl 2N à 105° pendant 18 heures) libère du glycérol (R_f = 0,46), du phosphate inorganique et de l'éthanolamine (R_f = 0,32) dans le solvant A.

Electrophorèse

Une partie de l'hydrolysat acide est soumis à une électrophorèse sur papier Whatman n°3, dans un tampon pyridine-acide acétique-eau (100:3,5:896,5, v/v/v) pH = 6,4, pendant 3 heures et sous une tension de 300 volts, en présence des témoins suivants: éthanolamine, alanine, acide glutamique.

La révélation par la ninhydrine indique uniquement la présence d'éthanolamine.

Tableau XVIII

	$H_{37}R_a$ + cyclosérine				$H_{37}R_a$ témoin			
	Alcool Ether 4 x 500 ml	Acétone Insoluble	$CHCl_3$ 3 x 500 ml	Acétone Insoluble	Alcool Ether	Acétone Insoluble	$CHCl_3$	Acétone Insoluble
Poids	3,03 g	231,5 mg	4,46 g	2,905 g	2,25 g	246 mg	2,750 g	1,208 g
Sucres		Mannose Inositol		Mann.Ara Gal, Glu (traces)		Mann.Inos traces lucose		Ara,Gal
Acides aminés		Asp.Mura-mique,Glut Gly,Ala, DAP		Asp.ac.Mu-ramique, Glut,Ala, Glyc,DAP Glucose		Asp.thr. Ser,Mura-mique,Glut Glyc,Ala DAP,Leu		Asp.ac.Mu-ramique Glut,Ala Glyc,DAP, Glucose
Acides gras				Acides mycoliques				Acides mycoliques

Constituants obtenus à partir d'extraits éthéroalcoolique et chloroformique pour le lot témoin et le lot traité par l'antibiotique

Bibliographie

1. E. Suter, R.A. White, Am.Rev.Tuberc., 70, 793 (1954).
2. H. Bloch, W. Segal, Am.Rev.Tuberc., 71, 228 (1955).
3. L. Nègre, "Prévention et Traitement Spécifiques de la Tuberculose par le BCG et l'antigène méthylique", Masson, Paris, (1956).
4. G. Biozzi, C. Stiffel, B.N. Halpern, D. Mouton, Rev.Fr.Etudes Clin.Biol., 5, 876 (1960).
5. E. Rich, "The Phatogenesis of Tuberculosis", Ed. Thomas, Springfield, (1944).
6. E. Suter, G.E. Ullman, R.G. Hoffman, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 99, 167 (1958).
7. B.N. Halpern, G. Biozzi, J.F. Howard, C. Stiffel, D. Mouton, C.R.Soc.Biol., 152, 899 (1958).
8. B.H. Waksmann, C.M. Pearson, T.J. Sharp, J.Immun 85, 403 (1960).
9. C.M. Pearson, F.D. Wood, A. Tanaka, Arthr. and Rheum., 7, 746 (1964).
10. A. Hammerschlag, Bakteriologish-chemische. Untersuchungen der Tuberkelbazillen, Wien.Akad.Ber., 97, 988 (1888); Monatshefte d.Chemie, 10, 9 (1889).
11. R.J. Anderson, Harvey Lectures, 35, 271 (1939).
12. R.J. Anderson, "The Chemistry of the Lipids of the Tubercle Bacillus", Yale, J.Biol.Med., 15, 311 (1941).
13. a) E. Lederer, "Chimie et Biochimie des Lipides des Mycobactéries" Symposium sur le Métabolisme Microbien, 2e Congrès Inter.Biochimie, Paris (1952).

    b) J. Asselineau, E. Lederer, "Chemistry and Metabolism of Bacterial Lipids in Lipids Metabolisms", K. Bloch ed., Wiley and Sons, N.Y. (1960).
14. E. Lederer, Chem.Phys.Lipids, 1, 294 (1967).
15. A.J. Crowle, Bacter.Rev., 22, 183 (1958).
16. a) L. Nègre, A. Boquet, "Sur les propriétés de l'antigène méthylique", Ann.Inst.Pasteur, 45, 415 (1930).
    b) "Action de l'antigène méthylique sur l'intoxication tuberculeuse expérimentale", C.R.Soc.Biol., 101, 442 (1929).
17. D.W. Weiss, R.J. Dubos, J.exp.Med., 110, 981 (1959).
18. M. Pigretti, E. Vilkas, E. Lederer, H. Bloch, Bull.Soc.Chim. Biol., 47, 2039 (1965).
19. H. Noll, H. Bloch, J. Asselineau, E. Lederer, Biochim.Biophys. Acta, 20, 299 (1956).

20. A. Bikierkunst, I.S. Levy, E. Yarkoni, E. Vilkas, A. Adam, E. Lederer, J.Bacteriol., 100, 95 (1969).

21. E. Coulaud, C.R.Hebd.Seanc.Soc.Biol.Paris, 119, 368 (1935).

22. J. Freund, Ad.Tuberc.Res., 7, 130 (1956).

23. R.G. White, L. Bernstock, R.G.S.Johns, E. Lederer, Immunology, 1, 54 (1958).

24. C. Larson, E. Ribi, Arch.Inst.Pasteur, Tunis, 41, 399 (1965).

25. R.L. Anacker, W.R. Barclay, W. Brehmer, G. Goode, R.H. List, E. Ribi, D.F. Tarmina, Am.Rev.Resp.Dis., 99, 242 (1969).

26. R.L. Anacker, W.D. Bickel, W. Brehmer, M. Niwa, E. Ribi, D.F. Tarmina, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 130, 723 (1969).

27. E. Ribi, W. Brehmer, K. Milner, Proc.Soc.exp.Biol., 124, 408, (1967).

28. A.S. Youmans, G.P. Youmans, Infect.Immun., 2, 659 (1970).

29. M.B. Lurie, J.Exp.Med., 75, 247 (1942).

30. E. Suter, J.Exp.Med., 97, 235 (1953).

31. R.J. Dubos, R.W. Schaedler, J.Exp.Med., 110, 981 (1959).

32. L.W. Hedgecook, Am.Rev.Resp.Dis., 92, 973 (1965).

33. J.G. Howard, G. Biozzi, B.N. Halpern, C. Stiffel, D. Mouton, Brit.J.Exp.Pathol., 40, 281 (1959).

34. J.S. Elberg, P. Schneider, J. Fong, J.Exptl.Med., 106, 545, (1967).

35. A.E. Fox, G.L. Evans, F.J. Turner, A. Blaustein, B.S. Schwartz, J.Reticulo endothelial Soc., 1, 359 (1964).

36. A.E. Fox, G.L. Evans, F.J. Turner, J.B. Schwartz, A. Blaustein, J.of Bactiorol., 92, 1 (1966).

37. A. Misaki, S. Yukawa, K.Tsuchiya, T. Yamasaki, J.Biochem., 59, 388 (1966).

38. E. Lederer, Pure Appl.Chem., 25, 135 (1971).

39. L. Bergman, A. Allison, H.G. Pereira, Int.J.Cancer, 2, 359 (1967).

40. J.L. Amiel, M. Berardet, Experientia, 8, 941 (1971).

41. B. Zbar, I. Bernstein, H.J. Rapp, J.Nat.C.Inst., 46, 831, (1971).

42. G. Mathé, J.L. Amiel, L. Schwarzenberg, M. Schneider, A. Cattan, J.R. Schlumberger, M. Mayat, F. de Vassal, Revue Fr. Etudes Clin.Biol., 13, 454 (1968).

43. B. Zbar, T. Tanaka, Science, 72, 271 (1971

44. A. Bikierkunst, I.S. Levy, E. Yarkoni, E. Vilkas, E. Lederer, Sciences, 174, 1240 (1971).

45. C. Cummins, M. Harris, J.Gen.Microbiol., 18, 173 (1958).

46. a) K. Takeya, K. Hisatsune, J.Bacteriol., 85, 16 (1963).
b) K. Takeya, K. Hisatsune, I. Inoue, J.Bacteriol., 85, 24 (1963).
47. A. Misaki, S. Yukawa, J.Biochem., 59, 511 (1966).
48. O.T. Avery, R.J. Dubos, J.Exptl.Med., 54, 73 (1931).
49. K. Kato, J.L. Strominger, S. Kotani, Bioch., 7, 2762 (1968).
50. S. Moore, W.H. Stein, J.Biol.Chem., 192, 663 (1951).
51. K.A. Piez, L. Morris, Anal.Biochem., 1, 187 (1960).
52. A.B. Archibald, J. Baddiley, Biochem.J,95, 19c (1965).
53. O. Westphal, O. Luderitz, F. Bister, Z.Naturf., 148, 7b (1952).
54. K. Clarke, G.W. Gray, D.A. Reaveley, Biochem.J., 105, 749, (1967).
55. G.O. Aspinall, R.B. Rashbrook, G. Kessler, J.Chem.Soc., 215, (1958).
56. D. Migliore, N.P.V. Acharya, P. Jolles, C.R.Acad.Sc.Paris, 263D, 846 (1966).
57. E. Vilkas, J. Markovits, C.R.Acad.Sc.Paris, 275C, 913 (1972).
58. J. Wietzerbin-Falszpan, B. Das, C. Gros, J.F. Petit, E. Lederer, Eur.J.Biochem., 32, 525 (1973).
59. G. Laneelle, C.R.Acad.Sc., 257 , 781 (1963)
60. a) C. Amar-Nacasch, E. Vilkas, Bull.Soc.Chim.Biol., 51, 613 (1969).
b) C. Amar-Nacasch, E. Vilkas, Bull.Soc.Chim.Biol., 52, 145 (1970).
61. J. Markovits, E. Vilkas, Biochim.Biophys.Acta, 192, 49 (1969).
62. E. Vilkas, J-M. Delaumeny, C. Amar-Nacasch, Biochim.Biophys. Acta, 158, 147 (1968).
63. J. Asselineau, "The Bacterial Lipids", Hermann, Paris, Holden Day, San Francisco (1966).
64. A.H. Etemadi, Exposés annuels de Biochimie médicale, Masson, Paris, 28, 77 (1967).
65. P.S. Goldman, N.P.V. Acharya, J.Bacteriol., 102, 733 (1970).
66. C.M. Wilson, Anal.Chem., 31, 1199 (1959).
67. S.I. Hakomori, J.Biochem.Japon, 55, 205 (1964).
68. H. Bjorndall, B. Lindberg, S. Svensson,Act.Chem.Scand., 21, 1801 (1967).
69. W.E. Trevelyan, D.P. Procter, J.S. Harrison, Nature, 166, 444 (1950).
70. I. Azuma, Y. Yamamura, A. Misaki, J.Bacteriol., 98, 331 (1969).

71. a) A. Misaki, N. Ikawa, I. Azuma, T. Kato, S. Kotani, Biochim.Biophys.Acta, 215, 405 (1970).

b) A. Misaki, N. Ikawa, I. Azuma, S. Kotani, Fith.Joint. Meeting Tuberculosis Panel, Tokyo, p.1 (1970).

72. J. Stanek, M. Cerny, J. Pacak, "The Oligosaccharides", Czechoslovak Academy of Sciences, 252 (1965).

73. P. Plackett, S.H. Buttery, Biochem.J., 90, 20 (1964).

74. R.L. Whistler, H.E. Conrad, J.Amer.Chem.Soc., 76, 1673 (1954).

75. J.K.N. Jones, W. Reid, J.Amer.Chem.Soc., 77, 1890 (1955).

76. H. Meier, Acta Chem.Scand., 16, 2275 (1962).

77. R.W. Bailey, E.J. Bourne, J.Chromatog., 4, 206 (1964).

78. P.A. Gorin, J.F. Spencer, Can.J.Chem., 37, 499 (1959).

79. Y.S. Ovodov, A.F. Pavlenko, J.Chromatog., 36, 531 (1968).

80. M.E. Gelpi, J.O. Deferrari, R.A. Cadenas, J.Chem.Soc., 498, (1968).

81. W.N. Haworth, Berichte, 65, 50 (1932).

82. J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegenthart, J. Vink, J.J. de Ridder, Tetrahedron, 27, 4275 (1971).

83. N.K. Kochetkov, O.S. Chizhov, N.V. Motodstov, Tetrahedron, 28, 5587 (1968).

84. J. Karkaïnen, Carbohy.Res., 11, 247 (1969).

85. J.P. Kamerling, M.J.A. de Bie, J.F.G. Vliegenthart, Tetrahedron, 28, 3037 (1972).

86. R.U. Lémieux, D.R. Lineback, Ann.Rev.Biochem., 32, 155 (1963).

87. Streeferk, Communication personnelle.

88. T.E. Acree, R.S. Shallenberger, L.R. Mattick, Carbohy.Res., 6, 498 (1968).

89. W.N. Haworth, Ber.A., 61, 50 (1932).

90. a)E.V. Rao, M.J. Watson, J.G. Buchanan, J. Baddiley, Bioch.J. III, 547 (1969).

b) M. Berst, C.G. Hellerqvist, B. Lindberg, O. Luderitz, S. Svensson, O. Westphal, Eur.J.Bioch., 11, 353 (1969).

91. T. Myazaki, T. Yadomae, Chem.Pharm.Bull.Tokyo, 17, 361 (1969).

92. J.W. Green, E. Pacsu, J.Amer.Chem.Soc., 59, 1205 (1937).

93. T. Iwashige, H. Saeki, Chem.Pharm.Bull.(Japon), 15, 1803 (1967).

94. L. Hough, Carbohy.Res., 21, 144 (1972).

95. M.E. Tate, C.T. Bishop, Can.J.Chem., 40, 1043 (1962).

96. a) I. Azuma, Y. Yamamura, J.Biochem.Tokyo, 52, 100 (1962).

b) I. Azuma, Y. Yamamura, J.Biochem.Tokyo, 53, 275 (1962).

97. N.P.V. Acharya, M. Senn, E. Lederer, C.R.Acad.Sci., 264, 2173 (1967).

98. E. Vilkas, J. Markovits, FEBS Letters, 2, 20 (1968).

99. A. Adam, M. Senn, E. Vilkas, E. Lederer, Eur.J.Biochem., 2, 460 (1967).

100. R.J. Anderson, R.E. Reeves, F.H. Stodola, J.Biol.Chem., 121, 649 (1937).

101. N. Fethke, "Substances lipoïdiques du bacille tuberculeux Ed.Hermann (1938).

102. W.B. Geiger, R.J. Anderson, J.Biol.Chem., 131, 539 (1939).

103. R.J. Anderson, M.M. Creighton, R.L. Peck, J.Biol.Chem., 133, 675 (1940).

104. R.A. Laidlaw, C.B. Wylam, J.Chem.Soc., 567 (1953).

105. O.K. Orlova, Biokhimie, 23, 467 (1958).

106. E. Chargaff, D.H. Moore, J.Biol.Chem., 155, 493 (1944).

107. P.W. Kent, M. Stacey, Biochem.Biophys.Acta, 3, 641 (1949).

108. A.D. Antoine, B.S. Tepper, Archiv.Biochim.Biophys., 134, 207 (1969).

109. C. Chihara, J. Hamuro, Y. Maeda, Y. Arai, F. Fukuoka, Nature, 225, 939 (1970).

110. J.L. Strominger, J.M. Ghuysen, Science, 156, 209 (1967).

111. R.C. Hughes, Biochem.J., 106, 41 (1968).

112. A. Adam, R. Ciorbaru, J.F. Petit, E. Lederer, Proc.nat.Acad. Sci. USA, 69, 851 (1972).

113. R. Rhuyage, E. Stenhagen, Arbiv.För Kemi Band, 15, n°50 (1960).

114. a) V. Braun, K. Rehn, Europ.J.Bioch., 10, 426 (1969).

b) V. Braun, U. Sieglin, Europ.J.Bioch., 13, 336 (1970).

c) V. Braun, H. Wolff, Europ.J.Bioch., 14, 387 (1970).

115. J. Sjöquist, J. Movitz, I.B. Johanson, H. Hjelm, Eur.J.Biochem., 30, 190 (1972).

116. E.N. Fox, M.K. Wittner, Immunochem., 6, 11 (1969).

117. S. Dutka, DEA (Juin 1971).

118. H.D. Heilmann, Eur.J.Biochem., 31, 456 (1972).

119. E. Vilkas, A. Rojas, B.C. Das, W.A. Wolstenholme, E. Lederer, Tetrahedron, 22, 2809 (1966).

120. C.B. Thorne, C.G. Gomez, H.E. Noyes, R.D. Housewright, J.Bacteriol., 68, 307 (1954).

121. G. Ivanovics, V. Bruckner, Z.Immunitäts,90, 304 (1937).

122. W.E. Hanby, H.N. Rydon , Biochem.J., 40, 297 (1946).

123. W.E. Hanby, S.G. Waley, J. Watson, J.Chem.Soc.,

124. F.A. Troy, J.Biol.Chem., 248, 305 (1973).

125. R.C.E. Guy, M.J. How, M. Stacey, M. Heidelberger, J.Biol. Chem., 242, 5106 (1907).

126. E.A. Kabat "Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry" (1968).

127. J.W. Goodman, D.E. Nitecki, Biochemistry, 5, 657 (1966).

128. M. Sela, M.H. Steiner, Biochemistry, 2, 416 (1963).

129. a) D.W. Smith, H.M. Randall, A.P. MacLennan, R.K. Putney, S.V. Rao, J. Bacteriol., 79, 217 (1960).

b) A.P. MacLennan, D.W. Smith, H.M. Randall, Biochem.J., 81, 309 (1961).

130. R.J. Anderson, Fortsch Chem.Org.Naturst, 3, 145 (1939).

131. A. Aebi, J. Asselineau, E. Lederer, Bull.Soc.Chim.Biol., 35, 661 (1953).

132. M.B. Goren, Bacteriol.Rev., 36, 33 (1972).

133. T. Tokunaga, A. Furuchi, T. Murohashi, Proceedings of Fith Joint Meeting Tuberculosis, Panel Japan-US Cooperative Medical Science Program, Tokyo, 85, (1970).

134. T. Gendre, E. Lederer, Biochemistry of Nitrogene, Helsinki, 313 (1955).

135. F. Paul, E. Vilkas, C.R.Acad.Sci., 254 , 3915 (1962).

136. a) M.A. Lanellee-Carrieu, Thèse de Doctorat es-Sciences Naturelles (1969).

b) J.C. Prome, Ch. Lacave, M.A. Laneelle, C.R.Acad.Sci., 269C, 1664 (1969).

137. a) J. Kawanami, A. Kimura, H. Otsuka, Biochim.Biophys.Acta, 152, 808 (1968).

b) J. Kawanami, H. Otsuka, Chem.Phys.Lipids, 3, 135 (1969).

138. a) A. Gorchein, Biochim.Biophys.Acta, 84, 356 (1964).

b) A. Gorchein, Biochim.Biophys.Acta, 152, 358 (1968).

139. A.P. MacLennan, Biochem.J., 82, 394 (1962).

140. D.W. Smith, H.M. Randall, A.P. MacLennan, E. Lederer, Nature, 186, 887 (1960).

141. G.B. Fregnan, D.W. Smith, H.M. Randall, J.Bacteriol., 82, 517 (1961).

142. M. Gastambide-Odier, P. Sarda, E. Lederer, Tetrahedron Letters, 3135 (1965).

143. M. Chaput, G. Michel, E. Lederer, Biochim.Biophys.Acta, 78, 329 (1963); 63, 310 (1962).

144. M. Ikawa, E.E. Snell, E. Lederer, Nature, 188, 558 (1960).

145. E. Vilkas, C.R.Acad.Sci., 262C, 786 (1966).

146. Subcomittee on Mycobacteria, J.Bacteriol., 82, 931 (1962).

147. J.L. Strominger, R.H. Threnn, S.S. Scott, J.Amer.Chem.Soc., 81, 3803 (1959).

148. F.C. Neuhaus, J.L. Lynch, Biochem., 3, 471 (1964).

149. H.L. David, D.S. Goldman, K. Takayoma, Infection and Immunity, 1, 74 (1970).

150. a) R.J. Anderson, "Occurrence of inosite in the phosphatide fraction of human tubercle bacillus", J.Amer.Chem.Soc., 52, 1607 (1930).

b) R.J. Anderson, E.G. Roberts, The Occurrence of mannose in the phosphatide fraction from the human avian and bovine tubercle bacillus, J.Biol.Chem., 89, 611 (1930).

151. a) E. Vilkas, E. Lederer, Bull.Soc.chim.Biol., 38, 111 (1956);

b) E. Vilkas, Thèse d'Etat, Juin 1960.

152. Y.C. Lee, C.E. Ballon, Biochemistry, 4, 1395 (1965).

153. J. Asselineau, "Les lipides bactériens", Herman, Paris (1962).

154. J. Markovits, Thèse de Doctorat d'Université (1971).

155. J.C. Dittmer, R.L. Lester, J.Lip.Res., 5, 126 (1964).

156. D. Subrahmanyan, A.N. Nandedkar, R. Viswanathan, Biochim.Biophys.Acta, 63, 542 (1962).

157. F. Kanetsuna, T. Imaeda, G. Cunto, Biochim.Biophys.Acta, 173, 343 (1969).

158. E. Vilkas, C. Amar-Nacasch, J. Markovits, J.F. Vliegenthart, J.P. Kamerling, BBA, 423 (1973).

159. S. Kotani, I. Yanagida, K. Kato, T. Matsuda, Biken Journal, 13, 249 (1970).

160. J. Wietzerbin-Falszpan, B.C. Das, I. Azuma, A. Adam, J.F. Petit, E. Lederer, Biochem.Biophys.Res.Commun., 40, 57 (1970).

161. R.G. White, Symposium à Prague, Proceedings, 71 (1964).

162. a) A. Adam, J.F. Petit, J. Wietzerbin-Falsz an, P. Sinay, D.N. Thomas, E. Lederer, FEBS Letters, 4, 87 (1969).

b) I. Azuma, D.N. Thomas, A. Adam, J.M. Ghuysen. R. Bonaly, J.F. Petit, E. Lederer, BBA, 208, 444 (1970).

163. T.Y. Liu, E.C. Gotschlich, J.Biol.Chem., 242, 471 (1967).

164. F. Kanetsuna, G. San Blas, Biochem.Biophys.Acta, 208, 434 (1970).

165. M. Dubois, A.K. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Roberts, P. Smith, Anal.Chem., 28, 350 (1956).

166. L.A. Elson W.T.J. Morgan, Biochem.J., 27, 1824 (1933)

167. C. Rimington, Methods Biochem.Anal., 2, 292 (1955).

168. E.J. King, Biochem.J., 26, 292 (1932).

169. V.P. Calkins, Anal.Chem., 15, 762 (1943).

170. S.M. Partridge, Nature, 164, 443 (1948).

171. H.T. Gordon, W.T. Thornburg, L.N. Werun, Anal.Chem., 28, 849, (1956).

172. N. Sharon, Proceeding of the 3rd Symposium on Fleming's Lysozyme, Milan, Avril (1964).

173. F.R.S. Hanes, Isherwood, Nature, 164, 1107 (1949).

174. R.S. Bandurski, B. Axelrod, J.Biol.Chem., 193, 405 (1951).

175. S. Burrows, F.S.M. Gryllo, J.S. Harrison, Nature, 170, 800 (1952).

176. G. Rouser, I. O'Brien, D. Heller, J.Amer.Oil Chemist's Soc., 38, 14 (1961).

177. E. Gal, Anal.Biochem., 24, 452 (1968).

178. T. Ziminsky, E. Barowski, J.Chromatog., 23, 480 (1966).

179. G.O. Aspinall, J.Chem.Soc., 1676 (1963).

180. E. Eegrive, Z.Analyt.Chem., 89, 123 (1932).

181. J. Markovits, E. Vilkas, E. Lederer, Eur.J.Biochem., 18, 287 (1971).

182. R. Charret, E. Fauré-Fremiet, J.Microscopic, 6, 1063 (1967).

183. J. Luft, J.Biophys.Biochem.Cytol., 9, 409 (1961).

184. E.S. Reynolds, J.Cell.biol., 17, 208 (1963).

Service de Reprographie
C.N.R.S.
Gif